

CLEONI DOS SANTOS CARVALHO

**PURIFICAÇÃO, CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS E
ISOENZIMAS DA LACTATO DESIDROGENASE
(L-Lactato: NAD⁺ oxidoreductase, E.C.1.1.1.27)
DO MÚSCULO EPAXIAL DE CURIMBATÁ,
Prochilodus scrofa, STEINDACHNER, 1881, E DE
Notothenia neglecta (PISCES, TELEOSTEI).**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre. Área de Zootecnia de Produtos Aquáticos Renováveis: Sub-área Fisiopatologia e Comportamento de Organismos Aquáticos do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná.

CURITIBA

1997

A COMISSÃO EXAMINADORA, ABAIXO ASSINADA,

APROVA A TESE

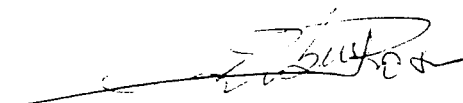
“PURIFICAÇÃO, CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS E ISOENZIMAS DA LACTATO DESIDROGENASE (L-Lactato: NAD⁺ oxidorreductase, E.C.1.1.1.27) DO MÚSCULO EPAXIAL DE CURIMBATÁ, *Prochilodus scropha*, STEINDACHNER, 1881, E DE *Notothenia neglecta* (PISCES, TELEOSTEI)”

ELABORADA PELA


BIÓLOGA

CLEONI DOS SANTOS CARVALHO

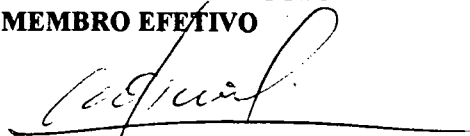
COMISSÃO EXAMINADORA:



**PROF. DR. RUBENS ROSA
PRESIDENTE/ORIENTADOR**



**PROF. DR. EDSON RODRIGUES
MEMBRO EFETIVO**



**PROF. DR. METRY BACILA
MEMBRO EFETIVO**

**CURITIBA
1997**

*Ao meu pai
À minha mãe*

*Aos meu irmãos
e aos meus sobrinhos
pela dedicação e carinho.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Metry Bacila, pela oportunidade e apoio, pelo incansável exemplo de dedicação à pesquisa e ao ensino, tão importante e significativo neste período de estudo, meu reconhecido agradecimento.

Ao Prof. Dr. Rubens Rosa, que me recebeu em seu laboratório, por sua orientação, amizade e honestidade.

Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues por sua orientação, amizade, dedicação e crítica em diversas etapas desta Tese.

Aos meus queridos amigos e colegas Carmen, Alexandra, Nilce, Edilmere, Lígia, Oraide, Solange e Margareth por toda ajuda e alegria compartilhadas.

Às Sras. Tânia Schrank e Deleuse Cherobim, pela amizade e auxílios prestados.

Aos funcionários Neuza Teruel Ribeiro e Arnor Joaquim da Silva, ambos do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, pela colaboração durante o desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao Departamento de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná, o meu reconhecido agradecimento pela pronta acolhida com que me recebeu para realizar meu mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa, da qual esta Tese é parte integrante.

Ao Centro de Cultivo de Peixes do IBAMA, Pirassumunga, São Paulo, pelo treinamento e fornecimento dos peixes, à Comissão Interministerial para os Recursos do Mar (CIRM) e ao Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR), tornando possível o nosso empreendimento e a realização dessa pesquisa.

Ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo, onde passei parte da minha vida profissional e onde foi realizada parte desta tese.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desta Tese.

CONTEÚDO

	Pág.
1 – INTRODUÇÃO	01
2 - MATERIAL E MÉTODOS	11
2.1 – Material Biológico	11
2.2 - Equipamentos.....	11
2.3 - Reagentes.....	12
2.4 - Métodos.....	12
2.4.1 - Preparação do homogeneizado	12
2.4.2 - Fracionamento com sulfato de amônio.....	13
2.4.3 - Cromatografia em oxamato-agarose	13
2.4.4 - Eletroforese em acetato celulose.....	14
2.4.5 - Análise cinética	15
2.4.5.1 - Determinação da atividade da lactato desidrogenase..	15
2.4.5.2 - Determinação da concentração de proteína.....	15
2.4.5.3 - Efeito da concentração hidrogeniônica	15
2.4.5.4 - Efeito do pH sobre o K_M para o piruvato.....	16
2.4.5.5 - Efeito da temperatura sobre a lactato desidrogenase..	16
2.4.5.6 - Determinação da energia de ativação.....	16
2.4.5.6 - Efeito da temperatura sobre o K_M para o piruvato	17
2.4.5.7 - Efeito do oxamato de sódio.....	17
2.4.5.8 - Efeito do oxalato de sódio.....	18
2.4.5.9 - Efeito do 3-acetil piridina-adenina dinucleotídeo	18
3 - RESULTADOS	20
3.1 - Purificação da LDH em oxamato de agarose de músculo estriado de <i>Prochilodus scropha</i> e <i>Notothenia neglecta</i>	20

3.2 - Estudo cinético da LDH de <i>Prochilodus scropha</i> e <i>Nototbenia neglecta</i>	20
3.2.1 - Efeito da concentração hidrogeniônica sobre a atividade da LDH	20
3.2.2 - Efeito do pH sobre o K_M para o piruvato	21
3.2.3 - Estabilidade da LDH de músculo estriado de <i>Prochilodus</i> <i>scropha</i> e <i>Nototbenia neglecta</i> em função da temperatura	21
3.2.4 - Efeito da temperatura sobre o K_M para o piruvato	22
3.2.5 - Determinação da energia de ativação da LDH de músculo estriado de <i>Prochilodus scropha</i> e <i>Nototbenia neglecta</i>	22
3.2.6 - Efeito do oxamato de sódio sobre a LDH	22
3.2.7 - Efeito do oxalato de sódio sobre a LDH	23
3.2.8 - Efeito do APAD sobre a LDH	23
3.3 - Eletroforese em acetato de celulose	24
 4 - DISCUSSÃO.....	 53
 5 - CONCLUSÕES	 68
 6 - SUMÁRIO	 70
 SUMMARY	 72
 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 74

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
TABELA I . Extração e purificação de LDH de músculo estriado de <i>Prochilodus scropha</i> em oxamato-agarose	25
TABELA II . Extração e purificação de LDH de músculo estriado de <i>Nototbenia neglecta</i> em oxamato-agarose	26
TABELA III . Efeito do pH sobre o K_M e a velocidade máxima do piruvato na atividade da LDH de <i>Prochilodus scropha</i> e <i>Nototbenia neglecta</i>	27
TABELA IV . Efeito da temperatura sobre o K_M e a $V_{m\acute{a}x}$ do piruvato na atividade da LDH de <i>Prochilodus scropha</i> e <i>Nototbenia</i> <i>neglecta</i>	28
TABELA V . Efeito do oxamato de sódio sobre a atividade da LDH de <i>Prochilodus scropha</i> e <i>Nototbenia neglecta</i>	29
TABELA VI . Efeito do oxalato de sódio sobre a atividade da LDH de <i>Prochilodus scropha</i> e <i>Nototbenia neglecta</i>	30
TABELA VII . Efeito do APAD sobre a atividade da LDH de <i>Prochilodus</i> <i>scropha</i> e <i>Nototbenia neglecta</i>	31

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1. Perfil cromatográfico da LDH em oxamato-agarose de músculo estriado de <i>Prochilodus scropha</i>	32
FIGURA 2. Perfil cromatográfico da LDH em oxamato-agarose de músculo estriado de <i>Nototbenia neglecta</i>	33
FIGURA 3. Efeito do pH na atividade da lactato desidrogenase de músculo estriado de <i>Prochilodus scropha</i>	34
FIGURA 4. Efeito do pH na atividade da lactato desidrogenase de músculo estriado de <i>Nototbenia neglecta</i>	35
FIGURA 5. Estudo do efeito do pH sobre o K_M para o piruvato de músculo estriado de <i>Prochilodus scropha</i>	36
FIGURA 6. Estudo do efeito do pH sobre o K_M para o piruvato de músculo estriado de <i>Nototbenia neglecta</i>	37
FIGURA 7. Estabilidade da LDH de músculo estriado de <i>Prochilodus scropha</i> em função da temperatura	38
FIGURA 8. Estabilidade da LDH de músculo estriado de <i>Nototbenia neglecta</i> em função da temperatura	39
FIGURA 9. Efeito da temperatura sobre a velocidade da ação enzimática e o K_M da LDH de músculo estriado de <i>Nototbenia neglecta</i>	40
FIGURA 10. Efeito da temperatura sobre a velocidade da ação enzimática e o K_M da LDH de músculo estriado de <i>Prochilodus scropha</i>	41
FIGURA 11. Determinação da energia de ativação da LDH de músculo estriado de <i>Prochilodus scropha</i> e de <i>Nototbenia neglecta</i>	42
FIGURA 12. Efeito do oxamato sobre a atividade da LDH de músculo estriado de <i>Prochilodus scropha</i> e de <i>Nototbenia neglecta</i>	43
FIGURA 13. Efeito do piruvato e do oxamato sobre a atividade da LDH de músculo estriado de <i>Prochilodus scropha</i>	44

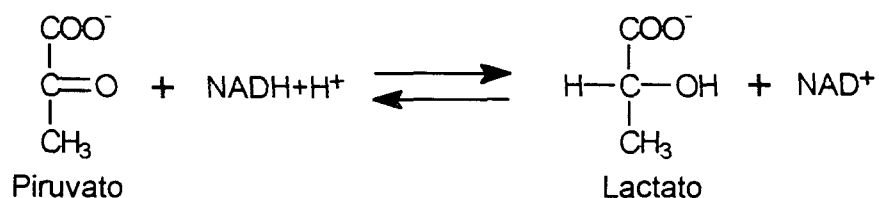
FIGURA 14. Efeito do piruvato e do oxamato sobre a atividade da LDH de músculo estriado de <i>Nototbenia neglecta</i>	45
FIGURA 15. Efeito do oxalato sobre a atividade da LDH de músculo estriado de <i>Prochilodus scropha</i> e de <i>Nototbenia neglecta</i>	46
FIGURA 16. Efeito do piruvato e do oxalato sobre a atividade da LDH de músculo estriado de <i>Prochilodus scropha</i>	47
FIGURA 17. Efeito do piruvato e do oxalato sobre a atividade da LDH de músculo estriado de <i>Nototbenia neglecta</i>	48
FIGURA 18. Efeito do APAD sobre a atividade da LDH de músculo estriado de <i>Prochilodus scropha</i> e de <i>Nototbenia neglecta</i>	49
FIGURA 19. Efeito do piruvato e do APAD sobre a atividade da LDH de músculo estriado de <i>Prochilodus scropha</i>	50
FIGURA 20. Efeito do APAD sobre a atividade da LDH de músculo estriado de <i>Nototbenia neglecta</i>	51
FIGURA 21. Perfil eletroforético de formas múltiplas da LDH de músculo estriado de <i>Prochilodus scropha</i> e <i>Nototbenia neglecta</i>	52

ABREVIATURAS

APAD	- 3-acetilpiridina adenina dinucleotídeo
BME	- B-mercaptoetanol
LDH	- Lactato desidrogenase
NAD ⁺	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado
NADH+H ⁺	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NBT	- Nitrobluetetrazolium
PMS	- Fenasina-meta-sulfonato
K _M	- Constante de Michaelis-Mentem
UI	- Unidade Internacional
V _{max}	- Velocidade máxima

1. INTRODUÇÃO

A láctico desidrogenase (LDH) (L-Lactato : NADH oxidorreductase, E.C.1.1.1.27), é de fundamental importância em processos envolvendo o metabolismo glicídico. Essa enzima catalisa a transformação reversível do lactato para piruvato, com suporte coenzimático do sistema $\text{NAD}^+/\text{NADH} + \text{H}^+$. É essencial para o suprimento de NAD^+ para a reação da gliceraldeído-fosfato desidrogenase, e desta forma, direcionar a finalização aeróbica ou anaeróbica da via glicolítica, frente às necessidades metabólicas do tecido de acordo com a seguinte reação :



Lactato desidrogenase de uma variedade de animais e tecidos tem sido purificada e analisada. Exemplos de estudos feitos de LDH são de músculo caudal de lagosta (KALOUSTIAN *et al.*, 1969); de testículos de ratos (SPIELMANN *et al.*, 1973); de músculo esquelético de canguru *Megaleia rufa*, de ornitorrinco *Ornitorynchus analitinus*, de opossum *Trichosurus vulpecula*, de guana *Varamus gouldii*, de peixe abissal *Antimora rostrata*, de équidna *Tachyglossus aculeatus*, de coelho *Oryctolagus cuniculus*, de galinha *Gallus domesticus* (BALDWIN, 1975); de músculo caudal de camarão (THÉBAULT *et al.*, 1981 e THÉBAULT, 1984); de fungos (SOLER *et al.*, 1981); de fígado de bacalhau (REHSE & DAVIDSON, 1985); de truta marrom (HENRY & FERGUSON, 1985); de músculo cardíaco de “icefish” *Channichthys rhinoceratus* (FELLER *et al.*, 1991) e de glândula submandibular de rato (TAKIGUCHI *et al.*, 1992 e SASSAKI *et al.*, 1994).

Estudos preliminares sobre este trabalho foram os de CARVALHO *et al.*, 1995a; 1995b; CARVALHO *et al.*, 1996a; 1996b e SALVO *et al.*, 1996.

A LDH é um tetrâmero de PM 140.000. Cada subunidade liga-se a uma molécula de coenzima e reage independentemente com o substrato (HECK, 1969). Dois tipos de subunidades estão presentes na proteína oligomérica de LDH e o padrão isoenzimático está relacionado com o tipo de metabolismo de cada tecido : o tipo H (coração) e o tipo M (músculo), de acordo com os órgãos em que foram obtidos (DAWSON *et al.*, 1964). O tipo H (ou tipo B) predomina em tecidos de metabolismo aeróbico, tal como o músculo cardíaco. É composta de 4 subunidades (H_4), sendo inibida por altas concentrações de piruvato (dentro de uma taxa fisiológica) e com baixo K_M para este substrato. O tipo M (ou tipo A) predomina em tecidos como o músculo esquelético, o qual deriva grande parte de sua energia da glicólise anaeróbica. A isoenzima do músculo esquelético está adaptada para converter altas concentrações de piruvato a lactato apresentando alto K_M e V_{max} elevado para o piruvato (SIDELL & BELAND, 1980).

O tipo H_4 oxida lactato a piruvato, sendo este utilizado como combustível pelo coração. O metabolismo aeróbico do coração permite que ele encaminhe o piruvato para o ciclo do ácido cítrico. O tipo M_4 opera na direção oposta, convertendo piruvato em lactato para permitir que a glicólise se processe em condições anaeróbicas. As interconversões entre piruvato e lactato são facilitadas por diferenças nas propriedades catalíticas das isoenzimas de LDH em diferentes tecidos.

A primeira LDH difosfopiridina-nucleotídeo dependente a ser isolada foi a de coração de bovinos, por STRAUB (1940).

Em mamíferos e aves, e em alguns peixes teleósteos, existe um terceiro tipo de LDH, denominada de LDH X ou isoenzima C. Em peixes, ela é encontrada no fígado (REHSE & DAVIDSON, 1985), no cérebro e no olho (FITCH, 1988; COPPES, 1992 e COPPES *et al.*, 1992), e em ratos, no

espermatoócito (SPIELMANN *et al.*, 1973).

Lactato desidrogenase existe numa variedade de formas isoenzimáticas, H_4 , H_3M_1 , H_2M_2 , H_1M_3 e M_4 . Essas formas isoenzimáticas são separadas por eletroforese em acetato de celulose e podem ser subsequentemente visualizadas em 5 bandas distintas por uma reação de coloração específica.

As isoenzimas H e M são similares no peso molecular mas diferem grandemente em propriedades físicas, químicas e imunológicas, como também nas propriedades catalíticas e em sua distribuição nos tecidos (VESELL, 1966; VESELL & YIELDING, 1966 e BAILEY & WILSON, 1968).

Vários métodos de eletroforese têm sido aplicados para a separação de isoenzimas da LDH. DIETZ & LUBRANO (1967), estabeleceram, por migração eletroforética, a separação das 5 isoenzimas da LDH do soro. BAILEY & WILSON (1968), por eletroforese em gel de amido, estabeleceram em truta arco-íris as 5 formas isoenzimáticas do tipo M e H. Amostras de LDH de diferentes espécies de truta, marron, arco-íris e de riacho, quando comparadas, apresentaram diferenças nos espaçamentos das isoenzimas do tipo H e M e variações na mobilidade eletroforética. Estes mesmos autores compararam a LDH do músculo esquelético e do cardíaco de truta com a LDH dos músculos esquelético e cardíaco de galinha. As duas formas isoenzimáticas de truta mostraram-se similares em peso molecular às formas isoenzimáticas de LDH de galinha, verificando-se também, homologia entre isoenzimas da LDH de truta com a de outros vertebrados. KALOUSTIAN *et al.* (1969), estabeleceram 3 bandas distintas, em LDH de lagosta migrando para o anódio em pH 7,0, embora os tipos isoenzimáticos não tenham sido definidos. FRITZ *et al.* (1970), através da eletroforese em gel de poliacrilamida de 3 diferentes tecidos de rato constataram a presença das 5 isoenzimas nos músculos cardíaco e esquelético, predominando o tipo H no coração e o tipo M no músculo esquelético e a presença de 3 isoenzimas no fígado, com predominância do tipo M. SOLER *et al.* (1981), com

eletroforese em gel de poliacrilamida, estabeleceram uma banda de proteína migrando para o catódio em *Phycomyces blakesleeanus*, correspondente à forma monomérica da enzima. DAVIE *et al.* (1986), através de eletroforese em gel de poliacrilamida com amostras de brânquias, de fígado, de músculo vermelho e branco de truta arco-íris, mostraram bandas de LDH típicas desses tecidos. COPPES *et al.* (1987), analisaram modelos isoenzimáticos da LDH de três espécies de peixes da família Scianidae, ordem Perciformes. As espécies mostraram distribuição específica da isoenzima A₄ de LDH, preferencialmente no músculo esquelético branco, B₄ no músculo cardíaco e C₄ no olho. ALMEIDA-VAL *et al.* (1990), estabeleceram 3 formas eletroforeticamente distinguíveis em cinco diferentes tecidos: músculo esquelético branco, músculo cardíaco, fígado, olho e cérebro de *Mylossoma duriventris* e *Colossoma macropomum*. Como em outros vertebrados, a LDH-A (tipo M) predominou no músculo esquelético branco e a LDH-B (tipo H) predominou no músculo cardíaco. Nos outros tecidos, a isoenzima B₄ predominou no fígado e no olho e o cérebro apresentou o mesmo perfil eletroforético para as 3 isoenzimas, A₄, B₂A₂ e B₄. FELLER *et al.* (1991), através de eletroforese em gel de poliacrilamida e eletroforese em gel de amido demonstraram, em músculos cardíaco e branco de “icefish”, que as formas isoenzimáticas H e M apresentam propriedades similares, compostas por somente um tipo isoenzimático, de PM 35.000, contrastando com outras espécies animais. TAKIGUCHI *et al.* (1992), através de eletroforese em gel de agarose, identificaram as 5 formas isoenzimáticas na glândula submandibular de rato, sendo o tipo H₄ encontrado em maior quantidade, cerca de 50%; SASSAKI *et al.* (1994), através de eletroforese em acetato de celulose constataram a presença de 5 isoenzimas da LDH na glândula submandibular de rato, com predominância das formas LDH 4 (M₃H) e 5 (M₄), de maneira semelhante ao músculo esquelético.

Estudos a respeito do mecanismo de interação da LDH com o substrato têm sido levados a efeito. NAD⁺ e NADH+ H⁺ devem ligar-se à enzima antes da ligação desta com o substrato, piruvato ou lactato, formando um

complexo ternário instável: LDH-coenzima-substrato, que se dissocia em complexo binário (FROMM, 1963 ; EVERSE *et al.*, 1971 e NARITA & HORIUCHI, 1979). O complexo é mais rapidamente formado com a LDH do tipo H do que com a do tipo M, em condições fisiológicas idênticas (EVERSE *et al.*, 1971 e HAMM , 1990).

De acordo com EVERSE *et al.* (1971) e DE ARRIAGA *et al.* (1982), desidrogenases piridino nucleotídeo-dependentes podem formar complexos abortivos ternários entre a enzima, a coenzima e o substrato, de modo que a inibição da LDH é na realidade o resultado deste complexo. Segundo esses autores, existe um incremento na inibição da LDH tipo H na presença de altas concentrações de piruvato em razão da formação do complexo ternário, LDH-coenzima-piruvato. O complexo formado não reage enzimaticamente e a LDH no metabolismo está sob controle do piruvato. O complexo ternário tem um papel regulador no metabolismo piruvato-lactato.

Cada uma das quatro subunidades da LDH se une à uma molécula de $\text{NADH} + \text{H}^+$. Os tipos H_4 e M_4 possuem quatro sítios de ligações diferentes. No tipo M_4 , o $\text{NADH} + \text{H}^+$, liga-se mais labilmente à enzima do que o tipo H_4 . A ligação com o NAD^+ , a qual concorre pelo mesmo sítio de ligação com o $\text{NADH} + \text{H}^+$, é comparativamente mais fraca. Altas quantidades de $\text{NADH} + \text{H}^+$, em relação ao NAD^+ induzem lentamente uma dissociação do complexo inativo que causa reativação da enzima e oxidação do $\text{NADH} + \text{H}^+$. Significante diminuição da concentração de $\text{NADH} + \text{H}^+$ na célula leva novamente à formação do complexo enzimático inativo e com isto a um bloqueio da oxidação do $\text{NADH} + \text{H}^+$. O efeito resultante é a manutenção de uma ligação constante de $\text{NADH} + \text{H}^+/\text{NAD}^+$ (HAMM, 1990). As concentrações de substrato e de coenzima são fatores importantes no sistema da LDH.

Estudos envolvendo a influência do pH e da temperatura sobre a atividade da LDH têm sido realizados em músculo cardíaco e

esquelético humano (VESELL, 1966); músculo cardíaco de suínos e músculo esquelético de coelho (VESELL & YIELDING, 1966); músculo esquelético, fígado e músculo cardíaco de truta de lago e fígado de truta de riacho *Salmo namaycush* e *Salvelinus fontinalis*, músculo esquelético de *Trematomus borchgrevinki*, músculo cardíaco e esquelético de atum *Thunnus thynnus* e músculo esquelético de peixe pulmonado *Lepidosiren paradoxa* (HOCHACHKA & SOMERO, 1968); músculo esquelético e cardíaco de *Pleuronectes platessa* (COWEY *et al.*, 1969); fígado de truta *Salvelinus fontinalis* e músculo esquelético de atum *Thunnus thynnus* (HOCHACHKA & LEWIS, 1971); músculos esquelético e cardíaco de cobra *Bothrops neuviidii* e de bovino (GEREZ DE BURGOS *et al.*, 1973); músculo esquelético de peixe de fundo (BALDWIN *et al.*, 1975); fígado e músculo esquelético branco de “goldfish” *Carassius auratus* (TSUKUDA, 1975 ; WILSON, 1977); músculo esquelético de peixes *Trematomus borchgrevinki*, *Sebastolobus alascamus*, *Hippoglossus stenolepis*, atum *Thunnus thynnus*, catfish *Hypostomus plecostomus*, *Gillichthys mirabilis* e *Potamotrygon sp* (YANCEY & SOMERO, 1978); *Phycomyces blakesleeam* (DE ARRIAGA *et al.*, 1982); músculo esquelético branco de *Oreochromis niloticus* (DOUMEN *et al.*, 1986); músculo esquelético e cardíaco de *Mylossoma duriventris* e *Colossoma macropomum* (ALMEIDA-VAL *et al.*, 1991); músculo esquelético de *Cynoscion striatus*, *Micropogonias furnieri* e *Roncador stearnsii* (COPPES *et al.*, 1992); embriões de peixe (KLYACHLO & OZERNYUK, 1994) ; músculo branco de *Cynoscion arenarius* e *Cynoscion nebulosus* (MARTÍNEZ *et al.*, 1994) e glândula submandibular de rato (SASSAKI *et al.*, 1994); músculo estriado epaxial de *Prochilodus scropha* (CARVALHO *et al.*, 1995a) ; soro de peixes (CARVALHO *et al.*, 1995b); músculo epaxial de *Notothenia neglecta* e *Prochilodus scropha* (CARVALHO *et al.*, 1996a e 1996b) e músculo epaxial de *Chaenocephalus aceratus* e *Hypostomus plecostomus* (SALVO *et al.*, 1996).

Com relação aos fatores físicos que frequentemente variam no ambiente, a temperatura é importante do ponto de vista fisiológico e bioquímico. Segundo HOCHACHKA & SOMERO (1968) ; COWEY *et al.* (1969) ; GEREZ DE BURGOS *et al.* (1973) ; NARITA & HORIUCHI (1979) ; FITCH (1988) e KLYACHKO & OZERNYUK, (1994) o K_M para a LDH aumenta com a elevação da temperatura e tende ser maior para a enzima de espécies adaptadas a altas temperaturas (YANCEY & SOMERO, 1978; TSUKUDA, 1975; SOMERO, 1981 e OZERNYUK *et al.*, 1994).

O efeito da temperatura nas propriedades cinéticas e estruturais de enzimas de animais pecilotérmicos reflete fatores específicos de adaptações bioquímicas desses organismos, como por exemplo a energia de ativação, a afinidade da enzima-substrato, a qual é definida pela constante de Michaelis-Menten (K_M). Para os animais pecilotérmicos, a afinidade da LDH para o piruvato varia com a temperatura aproximando-se de um valor mínimo dentro de uma determinada temperatura normal. A dependência do pH intracelular com a temperatura pode afetar o desempenho de muitas enzimas, dentre elas a LDH em particular. (YANCEY & SOMERO, 1978; SOMERO, 1981 e OZERNYUK *et al.*, 1994). Uma alteração na temperatura deverá promover diretamente uma mudança compensatória na afinidade da enzima ao substrato. A temperatura ótima, temperatura fisiológica, é definida como a temperatura através do qual os valores de K_M são mínimos, este fato de importância nos mecanismos de adaptação biológica (HOCHACHKA & SOMERO, 1968).

COWEY *et al.* (1969), com músculo esquelético e músculo cardíaco de *Pleuronectes platessa*, obtiveram valores de K_M para o piruvato similares em diferentes temperaturas, a 10°C, 0,1 e 0,11 mM e a 35°C, 0,9 e 1,0 mM, respectivamente. A LDH dos músculos esquelético e cardíaco, para esta espécie, foi inativada quando incubada a 56°C, durante 4 minutos.

LÓPEZ LEMUS (1987), trabalhando com quatro espécies do gênero *Epinephelus* adaptadas a diferentes temperaturas (18-24°C), verificou que os valores de K_M não se alteram nas diferentes espécies, cada uma analisada na sua temperatura corporal apropriada. O mesmo resultado foi observado por NARITA & HORIUCHI (1979), em músculo flexor de lagostim, *Procambarus carki*, adaptado a diferentes temperaturas de 5, 15 e 25°C, os valores de K_M têm sido aproximadamente os mesmos, isto é, 1,9, 2,0 e 2,1 x 10⁻⁴ M, respectivamente. Esse fato é interpretado como uma adaptação que assegura às enzimas reter a capacidade de elevar a taxa catalítica quando a concentração de substrato se eleva durante a ativação metabólica, que ocorre, por exemplo, durante exercícios vigorosos.

HOCHACHKA & SOMERO (1968), analisaram a LDH de espécies adaptadas a diferentes temperaturas e verificaram que estas apresentaram energia de ativação similares, entre 11-12 kcal/ mol, exceto para isoenzima C₄ (22,1 kcal/ mol). Aparentemente não se verificou correlação entre a energia de ativação e a temperatura ambiente própria de cada espécie.

COPPEs *et al.* (1987), estudaram a desnaturação pelo calor de isoenzimas de LDH. A isoenzima A₄ de *Micropogonias furnieri* e *Cynoscion striatus* foi mais sensível à inativação pelo calor do que as isoenzimas B₄ e C₄ sendo que a isoenzima B₄ mostrou-se mais termoestável. SASAKI *et al.*, 1989 em LDH-A₄ do músculo de *Oryzias latipes* pré-incubada 30 minutos a 50°C, verificaram que a preparação reteve cerca de 70% da sua atividade original, 40% da atividade da LDH-A₄ foi inativada por pré-incubação a 55°C por somente 5 minutos, sendo inativada completamente a 60°C. A LDH-B₄ apresentou-se mais estável que a LDH-A₄. ZIETARA & SKORKOWSKI (1993), analisando aloenzimas LDH de bacalhau *Gadus morhua*, verificaram que a LDH-B₄ e LDH-B'₄ foram estáveis quando incubadas a 55°C e a LDH-A₄ e LDH-C₄ estáveis acima de 50 e 65°C respectivamente, perdendo rapidamente suas atividades.

VESSEL (1966), verificou inibição da LDH-H pelo lactato em experimentos levados a efeito em pH 6.6, 7.0 e 8.3. Em pH 8.3, a LDH-M resiste a concentrações de lactato que são inibitórias para LDH-H. Efeitos do pH na inativação pelo calor foram determinados (VESSEL & YIELDING, 1966 e OZERNYUK *et al.*, 1994). LDH de fígado de truta de riacho aclimatada a 4° C e em diferentes pH mostrou que o aumento do K_M com a temperatura é maior em pH alcalino (pH 7,99) (HOCHACHKA & LEWIS, 1971) e que valores de K_M aumentam com a elevação do pH (GEREZ DE BURGOS *et al.*, 1973; WILSON, 1977; DOUMEN *et al.*, 1986 e MARTÍNEZ *et al.*, 1994). THÉBAULT *et al.* (1981); SASAKI *et al.*, (1989); ALMEIDA-VAL *et al.* (1991) e SASSAKI *et al.* (1994), verificaram pH ótimo na redução do piruvato em torno de 6.0 e 7.8, e na reação reversa em pH 9.0 - 10.5.

FITCH (1988), determinou a atividade máxima para o músculo esquelético de *Notothenia neglecta* e *Myocephalus scorpius* em concentrações de piruvato de 2,5mM e 4,0mM, respectivamente. Por outro lado, altas concentrações de lactato (40mM) elevam o K_M em todos os tecidos analisados, exceto no músculo cardíaco de *Notothenia neglecta*. SASAKI *et al.* (1989), em *Oryzias latipes* verificaram inibição da LDH na presença de alta concentração de piruvato, 10,0 mM, sendo reduzida a atividade da enzima em cerca de 60%. O K_M para o piruvato da LDH-A₄ e LDH-B₄ foi 0,62 mM e 0,19 mM, respectivamente. O K_M obtido para lactato foi de 8,9 mM para LDH-A₄ e de 4,0 mM para LDH-B₄. ALMEIDA-VAL *et al.* (1992), estudando as propriedades funcionais de 12 espécies de Serrasalmidae determinaram a inibição da LDH pelo piruvato no músculo esquelético branco e cardíaco desses peixes. Em ambos, a LDH de todas as espécies apresentou alta inibição quando submetida em concentrações elevadas de piruvato (10,0 mM), sendo que a atividade específica (U/mg de tecido) foi maior no músculo esquelético que no músculo cardíaco.

Estudos sobre o efeito de inibidores clássicos da LDH, oxamato, oxalato e APAD, são limitados a poucos trabalhos. Assim, ELLINGTON & LONG (1978), verificaram a inibição em d-LDH em músculo de craca gigante *Balamus nubilus*; GADE (1979), em manto muscular de lula *Loligo vulgaris*; THÉBAULT *et al.* (1981), em músculo caudal de camarão e SASSAKI *et al.* (1994), em glândulas submandibulares de rato *Rattus norvegicus albinus*.

Peixes da família Notothenidae são abundantes e amplamente distribuídos nos mares antárticos, sendo o grupo de peixes mais diversificado em relação a espécie, habitat e distribuição. Evidências sugerem que espécies de peixes Antárticos tornaram-se isolados pela convergência circumpolar Antártica durante o período terciário e têm evoluído independentemente de outros grupos de teleósteos sob pressão seletiva de glaciações sucessivas desde aquele tempo (De WITT, 1971).

A LDH de músculo estriado branco de *Notothenia neglecta* vem sendo investigada e comparada com *Prochilodus scropha*, uma espécie subtropical (CARVALHO *et al.*, 1995a; 1995b; CARVALHO *et al.*, 1996a; 1996b e SALVO *et al.*, 1996).

O objetivo fundamental deste trabalho é o de analisar, a nível molecular, os mecanismos bioquímicos de adaptações biológicas experimentados por peixes antárticos em seu ecossistema antártico. Assim, os objetivos do presente trabalho consistem na purificação da LDH em músculo estriado branco de *Notothenia neglecta* e de curimatá, *Prochilodus scropha*, através de cromatografia de afinidade; estudos cinéticos para melhor se entender a participação da LDH no metabolismo desses tecidos; e verificar a presença de formas múltiplas da enzima que determinam o padrão isoenzimático e que estabelece o tipo de metabolismo do tecido.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Biológico

A LDH foi obtida e purificada a partir de músculo estriado branco de exemplares de *Prochilodus scropha*, curimatá, capturados no Centro de Cultivo de Peixes do IBAMA, Pirassununga, São Paulo.

Peixes adultos foram levados para o laboratório do Centro de Cultivo, onde foram sacrificados por secção da coluna vertebral. A seguir, os tecidos musculares estriados foram dissecados, lavados em solução fisiológica a 4°C, armazenados e mantidos a 4°C, e transportados para o Instituto de Química da Universidade de São Paulo, em isopor contendo gelo seco.

O material biológico de *Notothenia neglecta* foi obtido durante a Operação Verão da XIV Expedição Antártica Brasileira. Peixes adultos foram levados para o Laboratório da Estação, onde foram sacrificados por secção da coluna vertebral. A seguir, os tecidos musculares estriados foram dissecados, lavados em solução fisiológica a 4°C, armazenados e mantidos a 4°C, e transportados para os nossos laboratórios em isopor contendo gelo seco.

2.2. Equipamentos

Na primeira fase do trabalho os equipamentos utilizados foram os do laboratório de Bioquímica do Instituto de Química, da Universidade de São Paulo, que constam dos seguintes: centrífuga refrigerada SORVALL-RC2B, potenciômetro Micronal B374, homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem, balança analítica Sartorius Analytic, espectrofotômetro Beckman DU acoplado a um registrador Gilford 2000 e à temperatura de $25,0 \pm 2,0$ °C, placas de eletroforese, estufa e freezer.

Para a segunda fase do trabalho os equipamentos utilizados foram os do Laboratório de Piscicultura, do Setor de Ciências Agrárias, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias: centrífuga refrigerada K70D, agitador rotatório Fisatom, potenciômetro Micronal B374, homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem, balança analítica Sartorius Analytic, espectrofotômetro BECKMAN DU 640 acoplado a um controlador de temperatura “Peltier”, estufa e freezer .

2.3. Reagentes

Piruvato de sódio, nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido ($\text{NADH} + \text{H}^+$) e oxidado (NAD^+), lactato de lítio, oxamato de sódio, oxalato de sódio, 3-acetilpiridina adenina dinucleotídeo (APAD), fenasina-meta-sulfonato (PMS), nitrobluetetrazolium (NBT), resina oxamato de agarose, albumina de soro bovino, foram adquiridos da Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.

Produtos inorgânicos utilizados foram todos pró-análise.

2.4. Métodos

2.4.1. Preparação do Homogeneizado

Frações de cerca de trinta gramas de músculo estriado congelado de *Prochilodus scropha* e *Notothenia neglecta* foram lavados em solução salina 0,9% e ressuspensos em tampão fosfato 33mM, pH 6,5 , contendo MgCl_2 1mM e β ME 0,5 mM. Os tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato pH 6,5 , na proporção de 1:4 de tampão em homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem. Os homogeneizados foram centrifugados em centrífuga refrigerada K70D, 4° C, a 10.000 rpm, durante 30 minutos. Os sedimentos foram desprezados e os sobrenadantes,

denominados extrato bruto (EB), foram mantidos em temperatura aproximada de 0-4°C até as etapas seguintes de purificação.

2.4.2. Fracionamento com sulfato de amônio

Foi adicionado ao EB, para ambas as preparações, sulfato de amônio sólido, lentamente, sob agitação constante, até atingir 70% de saturação. Após agitação de 10 minutos e repouso de uma hora, a suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm por 30 minutos, a 4°C. O sedimento (EB 70%) foi ressuspensão no mesmo tampão de homogeneização, em volume suficiente para ressuspendê-lo. O EB 70% foi dialisado contra tampão fosfato 10 mM, pH 6,5, contendo β ME 1mM e glicerol 10%, durante aproximadamente 15 horas, a 4°C. O dialisado foi centrifugado a 10.000 rpm durante 30 minutos, a 4°C. O sedimento foi desprezado e o sobrenadante (D70%) utilizado nas etapas seguintes.

Nos experimentos que se seguem indicasse como fração D70% a preparação ativa de LDH obtida por precipitação a 70% de saturação de sulfato de amônio, ressuspensão em tampão de homogeneização e dialisado em tampão fosfato 10 mM, pH 6,5, contendo β ME 1mM e glicerol 10%.

2.4.3. Cromatografia em oxamato de agarose

A LDH do extrato bruto, foi purificada por cromatografia de afinidade em oxamato de agarose. A cromatografia foi executada segundo o método de O'CARRA e BARRY, 1972. A resina de oxamato de agarose foi transferida para coluna de vidro de 0,7 x 10,0 cm e lavada em tampão fosfato de potássio 0,02 M, pH 6,8 contendo NaCl 0,5 M, equilibrada em tampão fosfato de potássio 0,02 M, pH 6,8 contendo NaCl 0,5 M e NADH+ H⁺ 0,2 mM.

Cerca de cinco gramas de músculo estriado congelado, para ambas as espécies, foram lavadas em solução salina 0,9% e ressuspensas em tampão fosfato 0,02 M, pH 6,8, contendo NaCl 0,5 M. Os tecidos foram

homogeneizados em tampão fosfato de potássio 0,02 M, pH 6,8, contendo NaCl 0,5 M, na proporção de 1:4 de tampão em homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem. Os homogeneizados foram centrifugados em centrífuga refrigerada K70D, 4°C, a 10.000 rpm, durante 30 minutos. Os sedimentos foram desprezados; os sobrenadantes, denominados de extrato bruto (EB), utilizados como fonte de enzima. Aliquotas de 3,0 ml do extrato bruto, de ambas preparações, foram adicionadas de NaCl 0,5 M e NADH + H⁺ 0,2 mM, pH 6,8 e adicionadas à coluna de oxamato de agarose. O fluxo foi ajustado para 1,0 ml/20 minutos. Após a fixação da enzima, a coluna foi lavada com tampão fosfato de potássio 0,02 M, pH 6,8 contendo NaCl 0,5 M e NADH + H⁺ 0,2 mM até que a leitura de absorbância a 280 nm não mais indicasse a presença de proteína. A enzima foi eluída com o mesmo tampão, na ausência de NADH + H⁺. As frações coletadas foram então analisadas quanto à atividade de LDH e concentração de proteína.

2.4.4. Eletroforese em acetato de celulose

A separação das formas isoenzimáticas da LDH foi realizada através da eletroforese em acetato de celulose, utilizando-se o extrato bruto de músculo estriado branco de *Prochilodus scropha* e *Notothenia neglecta* obtidos como descrito na Metodologia. O método empregado foi o descrito por BARNETT, 1962, usando-se tampão barbital de sódio 0,04 M, pH 8,6 e fitas de acetato de celulose (2,5 x 14 cm) a 200V, 23 mA, durante 2 horas a 4°C.

As fitas foram reveladas sobre camada de ionagar 5mg/ml solidificada em placa de vidro, contendo lactato de lítio 0,1M, NAD⁺ 1,5mM, NBT 0,4mM, PMS 0,1mM, em estufa a 37°C, durante 40 minutos no escuro. Após a revelação, as fitas foram desidratadas em metanol puro e diafanizadas em solução contendo metanol 85%, ácido acético glacial 14% e glicerol 1%.

2.4.6. Análise cinética

2.4.6.1. Determinação da atividade da lactato desidrogenase

A atividade da LDH foi medida em meio contendo NADH + H^+ 0,14 mM e piruvato de sódio 1 mM, em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4, em volume final de 1,0 ml, segundo BERGMEYER & BERN, 1974. A velocidade de oxidação do NADH + H^+ foi acompanhada em espectrofotômetro BECKMAN DU 640, em comprimento de onda de 340 nm e à temperatura de 25°C para *Prochilodus scropha* e entre 8,0 ± 2,0°C para *Notothenia neglecta*.

Uma unidade (UI) de LDH é definida como a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 micromol de piruvato ou de lactato por minuto, nas condições de ensaio especificadas. A atividade específica é expressa em UI/mg de proteína.

2.4.6.2. Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando-se como padrão protéico a albumina sérica bovina.

2.4.6.3. Efeito da concentração hidrogeniônica

A atividade da LDH, da fração D70%, foi medida em meio de reação indicado em 2.4.6.1., porém foram utilizadas, para tanto, diferentes concentrações hidrogeniônicas; Tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 3.6 a 9.0; Tampão fosfato 0,2 M pH 6.0 a 8.5; Tampão TRIS-HCl 0,2 M pH 5.2 a 9.0. A velocidade de oxidação do NADH + H^+ foi acompanhada a 340 nm em espectrofotômetro BECKMAN DU 640.

2.4.6.4. Efeito do pH sobre o K_M para o piruvato

O efeito do pH sobre o K_M para o piruvato foi determinado sobre a fração D70% em meio de reação indicado em 2.4.6.1., na presença de diferentes concentrações de piruvato: 0,02 - 2,5 mM. A atividade enzimática foi determinada em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 6,0, 7,0 e 8,0.

2.4.6.5. Efeito da temperatura

A estabilidade da LDH à temperatura foi determinada em meio de reação contendo NADH + H^+ 0,14 mM e piruvato de sódio 1 mM, em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4, em volume final de 1,0 ml. Aliquotas da fração D70% foram incubadas nas seguintes temperaturas: 5, 20, 30 e 50°C por 5, 10, 20 e 30 minutos, determinando-se a atividade enzimática após cada incubação. A velocidade de oxidação do NADH + H^+ foi acompanhada em espectrofotômetro BECKMAN DU 640, em comprimento de onda de 340 nm, à temperatura de 25°C para *Prochilodus scropha* e entre 8,0 \pm 2,0°C para *Notothenia neglecta*.

2.4.6.6. Determinação da energia de ativação

A medida da energia de ativação sobre a atividade da LDH da fração D70%, foi analisada em meio de reação indicado em 2.4.6.1., saturante de piruvato e NADH + H^+ . O meio de reação contendo a amostra de LDH pré-incubada nas seguintes temperaturas 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50°C durante 5 minutos, determinando-se a atividade enzimática após cada incubação nas temperaturas indicadas.

O cálculo da energia de ativação foi realizado segundo a equação de Arrhenius.

$$\text{LogK} = - \frac{E_a}{2,3R} * \frac{1}{T} + \text{LogA}$$

Onde,

K = constante de velocidade específica da reação para uma dada temperatura ;

E_a = energia de ativação ;

A = constante particular de cada reação

Uma vez que a velocidade de determinada reação é proporcional a K , assumiu-se como $\log K$ o \log da velocidade.

2.4.6.7. Efeito da temperatura sobre o K_M para o piruvato

O efeito da temperatura sobre o K_M da LDH para o piruvato foi determinado sobre a fração D70% em meio de reação indicado em 2.4.6.1., frente a concentrações de piruvato de 0,02mM-2,5mM. O meio de reação, contendo a amostra da LDH em diluições adequadas, foi mantido nas seguintes temperaturas, 10, 20 e 30°C durante 5 minutos. A atividade enzimática foi determinada nessas temperaturas após cada incubação, com adição de piruvato de sódio nas concentrações indicadas.

2.4.6.8. Efeito do oxamato de sódio

O estudo do efeito da concentração do oxamato de sódio sobre a atividade da LDH da fração D70% foi analisado em meio de reação contendo NADH + H^+ 0,14 mM e piruvato de sódio 1 mM, em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4, variando-se a concentração do oxamato de 0,05 - 2,0 mM, em um volume final de 1,0 ml. Em outra série de experimentos, o efeito do oxamato de sódio sobre a atividade da LDH no D70 % foi estudado em meio de reação contendo NADH + H^+ 0,14 mM, tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4, mantendo-se a concentração do oxamato constante (0,5 mM) e variando-se a concentração do piruvato de 0,05 - 2,5 mM. A atividade enzimática foi então determinada.

A velocidade de oxidação do $\text{NADH} + \text{H}^+$ foi acompanhada em espectrofotômetro BECKMAN DU 640, em comprimento de onda de 340 nm e à temperatura de 25°C para *Prochilodus scropha* e entre $8,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ para *Notothenia neglecta*.

2.4.6.9. Efeito do oxalato de sódio

O estudo do efeito da concentração do oxalato de sódio sobre a LDH da fração D70% foi analisado em meio de reação contendo $\text{NADH} + \text{H}^+$ 0,14 mM e piruvato de sódio 1 mM, em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4, variando-se a concentração do oxalato de 0,05 - 3,0 mM, em um volume final de 1,0 ml. Em outra série de experimentos, o efeito do oxalato de sódio sobre a atividade da LDH no D70 % foi estudado em meio de reação contendo $\text{NADH} + \text{H}^+$ 0,14 mM, tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4, mantendo-se a concentração do oxalato constante (0,05 mM) e variando-se a concentração do piruvato de 0,05 - 2,5 mM. A atividade enzimática foi então determinada.

A velocidade de oxidação do $\text{NADH} + \text{H}^+$ foi acompanhada em espectrofotômetro BECKMAN DU 640, em comprimento de onda de 340 nm e à temperatura de 25°C para *Prochilodus scropha* e entre $8,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ para *Notothenia neglecta*.

2.4.6.10. Efeito do 3-acetilpiridina-adenina dinucleotídeo (APAD)

O estudo do efeito da concentração do APAD sobre a atividade da LDH da fração D70% foi analisado em meio de reação contendo $\text{NADH} + \text{H}^+$ 0,14 mM e piruvato de sódio 1 mM, em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4, variando-se a concentração do APAD de 0,05 - 1,0 mM, em um volume final de 1,0 ml. Em outra série de experimentos, o efeito do APAD sobre a atividade da LDH no D70 % foi estudado em meio de reação contendo $\text{NADH} + \text{H}^+$ 0,14 mM, tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4, mantendo-se a concentração do APAD constante

(1,0 mM) e variando-se a concentração do piruvato de 0,05 - 2,5 mM. A atividade enzimática foi então determinada.

A velocidade de oxidação do $\text{NADH} + \text{H}^+$ foi acompanhada em espectrofotômetro BECKMAN DU 640, em comprimento de onda de 340 nm e à temperatura de 25°C para *Prochilodus scropha* e entre $8,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ para *Notothenia neglecta*.

3. RESULTADOS

3.1. Purificação da lactato desidrogenase de músculo estriado de *Prochilodus scropha* e *Notothenia neglecta* em oxamato de agarose.

A desidrogenase do lactato de *Prochilodus scropha* e *Notothenia neglecta* foi extraída e purificada por cromatografia de afinidade em coluna de oxamato-agarose. Os dados são mostrados nas tabelas I e II.

O perfil cromatográfico de eluição em oxamato-agarose da LDH de *Prochilodus scropha* e *Notothenia neglecta* é mostrado nas figs. 1 e 2.

3.2. Estudo cinético da lactato desidrogenase de *Prochilodus scropha* e *Notothenia neglecta*.

Análise do comportamento cinético da LDH de músculo estriado de *Prochilodus scropha* e *Notothenia neglecta* obtida a partir de purificação parcial foi realizada pelo estudo dos parâmetros que a seguir são tratados.

3.2.1. Efeito da concentração hidrogeniônica sobre a atividade da LDH.

Lactato desidrogenase de *Prochilodus scropha* e de *Notothenia neglecta* mostraram pH ótimo em torno de 6,5-7,5 e 6,6-7,0 respectivamente, usando-se para as determinações, tampão TRIS-HCl 0,2 M, tampão citrato fosfato 0,1 M e tampão fosfato 0,2 M, nos diferentes valores de pH, de acordo com as Figs. 3 e 4.

3.2.2. Efeito do pH sobre a velocidade e o K_M de LDH para piruvato.

As figs. 6 e 7 mostram a relação que existe entre o pH em tampão fosfato e a velocidade da ação da LDH preparada para *Prochilodus scropha* e de *Notothenia neglecta*. Os valores de K_M nas distintas situações são mostrados na tabela Tabela III

3.2.3. Estabilidade da lactato desidrogenase de músculo estriado de *Prochilodus scropha* e de *Notothenia neglecta* em função da temperatura.

Estudo da sensibilidade térmica de LDH de músculo estriado de *Prochilodus scropha* e de *Notothenia neglecta* foi levado a efeito em meio de reação (1,0 ml) contendo tampão fosfato 0,1 M, piruvato de sódio 0,1 mM, NADH + H^+ 0,14 mM, pH 7,4. A reação foi iniciada pela adição da LDH pré-incubada durante 5, 10, 20 e 30 minutos às temperaturas de 5, 20, 30, 50 e 60°C. A velocidade da reação foi seguida a 340 nm em espectrofotômetro, pela oxidação do NADH + H^+ , a $25,0 \pm 2,0^\circ C$ para *Prochilodus scropha* e a $8,0 \pm 2,0^\circ C$ para *Notothenia neglecta*. Pelos valores obtidos no experimento, verificou-se que a LDH de *Notothenia neglecta* permaneceu estável em 5,0°C, apresentando um aumento da atividade com o aumento da temperatura (20,0°C). Por outro lado, LDH de *Prochilodus scropha* mostrou-se estável em 5, 20 e 30°C, apresentando um pico de atividade em 30°C quando incubada 30 min, decrescendo a sua atividade, cerca de 4 vezes, em 50°C após 10 minutos de incubação. A LDH de ambas as espécies foi inativada quando incubada a 60°C durante 5 minutos (Figs. 7 e 8).

3.2.4. Efeito da temperatura sobre a velocidade e o K_M de LDH para piruvato.

As figs. 9 e 10 mostram a relação que existe entre a temperatura e a velocidade da ação da LDH preparada para *Prochilodus scropha* e de *Notothenia neglecta*. Os valores de K_M nas distintas situações são mostrados na tabela Tabela IV.

3.2.5. Determinação da energia de ativação da LDH de músculo estriado de *Prochilodus scropha* e *Notothenia neglecta*.

Os resultados obtidos foram registrados na forma de gráfico de Arrhenius e a energia de ativação, calculada com descrito em 2.4.6.6., foi de 7.591 cal/mol para *Prochilodus scropha* e de 6.567 cal/mol para *Notothenia neglecta*, e a curva estabelecida foi linear no intervalo de temperatura abrangido no experimento (Fig. 11).

3.2.6. Efeito do oxamato de sódio sobre a lactato desidrogenase.

Na concentração de 0,1 mM o oxamato causa inibição de 21% da atividade de LDH de *Prochilodus scropha* e 2,34% em *Notothenia neglecta*. Em concentrações crescentes de oxamato, a inibição da atividade da LDH atinge níveis de 70,5% em *Prochilodus scropha* e 41,48% em *Notothenia neglecta*, com oxamato 2,0 mM (Fig. 12).

Em concentrações crescentes de piruvato, mantendo-se a de oxamato em 0,5mM, o K_M da LDH para o piruvato foi de 0,0378 para *Prochilodus scropha* e de 0,0412 mM para *Notothenia neglecta*. Na ausência do oxamato o K_M foi de 0,0887 e 0,0936 mM para *Prochilodus scropha* e *Notothenia neglecta*, respectivamente (Figs. 13 e 14)(Tabela V).

3.2.7. Efeito do oxalato de sódio sobre a lactato desidrogenase.

Na concentração de 0,1mM de oxalato, houve inibição de cerca de 24% da atividade da lactato desidrogenase de *Prochilodus scropha* e de 7% em *Notothenia neglecta*. Lactato desidrogenase de *Notothenia neglecta* e *Prochilodus scropha* apresentaram inibição de aproximadamente 40% de sua atividade na maior concentração testada, 3,0 mM. A LDH de *Prochilodus scropha* mostrou-se mais sensível à inibição do oxalato (Fig. 15).

Em concentrações crescentes de piruvato, mantendo-se a de oxalato em 0,5mM, o K_M da LDH para o piruvato foi de 0,045 mM para *Prochilodus scropha* e 0,0704 para *Notothenia neglecta*. Na ausência do oxalato o K_M da LDH para o piruvato foi de 0,041 e 0,128 mM para *Prochilodus scropha* e *Notothenia neglecta*, respectivamente (Figs. 16 e 17)(Tabela VI).

3.2.8. Efeito do 3-acetilpiridina-adenina dinucleotídeo (APAD).

O efeito do APAD sobre a atividade da LDH de músculo estriado branco de *Prochilodus scropha* e de *Notothenia neglecta* foi estudado de acordo com procedimentos descritos em Métodos.

LDH de *Notothenia neglecta* e de *Prochilodus scropha* apresentaram inibição de aproximadamente 95% na concentração de 0,25 mM de APAD. A LDH de *Notothenia neglecta* mostrou-se mais sensível na menor concentração testada (0,05 mM), apresentando cerca de 20% de atividade residual e *Prochilodus scropha*, 68% (Fig. 18).

Em concentrações crescentes de piruvato, mantendo-se fixa a concentração de APAD em 1,0mM, o K_M da LDH para o piruvato foi de 0,1892 mM para *Prochilodus scropha* e 0,1166 mM para *Notothenia neglecta*. Na ausência de APAD o K_M foi de 0,0286 e 0,682 mM para *Prochilodus scropha* e

Notothenia neglecta, respectivamente (Figs. 19 e 20)(Tabela VII).

3.3. Eletroforese em acetato de celulose.

A eletroforese em acetato de celulose revelou a presença da isoenzima LDH-4, correspondente a M_4 (A_4), para o músculo esquelético branco de ambas as espécies. As isoenzimas de *Prochilodus scropha* e de *Notothenia neglecta* apresentaram perfil eletroforético distintos, a LDH-4 de *Prochilodus scropha* mostrou mobilidade eletroforética em direção ao cátodo e a LDH-4 de *Notothenia neglecta* mobilidade ao ânodo (Fig. 21).

TABELA I - Extração e purificação de LDH de músculo estriado de *Prochilodus scropha* em oxamato-agarose.

AMOSTRA	Proteína (mg/ml)	Volume (ml)	Atividade (UI/ml)	Atividade específica (UI/mg de proteína)	Rendimento (%)	Purificação (X)
Extrato Bruto	20,77	1,00	503,38	24,33	100,00	1,00
Eluato da coluna oxamato-agarose	0,06	1,00	227,33	3726,72	45,16	153,80

O extrato bruto obtido a partir de músculo estriado branco de *Prochilodus scropha* homogeneizado com tampão fosfato 0,02M, pH 6,8 , contendo NaCl 0,5M na proporção de 3,0ml/g de tecido em homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem foi centrifugado em centrífuga refrigerada K70D por 30 min a 10.000 rpm e, então, adicionado de NADH^+H^+ 0,2mM e NaCl 0,5M. A preparação final contendo 20,77 mg/ml de proteína, foi aplicada à coluna de oxamato-agarose. A eluição foi levada a efeito no mesmo tampão sem NADH^+H^+ , acompanhada de leituras de absorbância a 280 nm e a atividade enzimática medida de acordo com o procedimento descrito em Métodos.

TABELA II - Extração e purificação de LDH de músculo estriado de *Notothenia neglecta* em oxamato-agarose.

AMOSTRA	Proteína (mg/ml)	Volume (ml)	Atividade (UI/ml)	Atividade específica (UI/mg de proteína)	Rendimento (%)	Purificação (X)
Extrato Bruto	33,30	1,00	113,99	3,42	100,00	1,00
Eluato da coluna oxamato-agarose	0,048	1,00	78,46	1651,79	68,83	482,98

O extrato bruto obtido a partir de músculo estriado branco de *Notothenia neglecta* homogeneizado com tampão fosfato 0,02M, pH 6,8 , contendo NaCl 0,5M na proporção de 3,0ml/g de tecido em homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem foi centrifugado em centrífuga refrigerada K70D por 30 min a 10.000 rpm e, então, adicionado de NADH⁺H⁻ 0,2mM e NaCl 0,5M. A preparação final contendo 33,30 mg/ml de proteína, foi aplicada à coluna de oxamato-agarose. A eluição foi levada a efeito no mesmo tampão sem NADH⁺H⁻, acompanhada de leituras de absorbância a 280 nm e a atividade enzimática medida de acordo com o procedimento descrito em Métodos.

TABELA III - Efeito do pH sobre o K_M e a velocidade máxima do piruvato na atividade da LDH de *Prochilodus scropha* e de *Notothenia neglecta*.

<i>Constante</i>	<i>Prochilodus scropha</i>			<i>Notothenia neglecta</i>		
pH	6,0	7,0	8,0	6,0	7,0	8,0
V _{max} (U/ml)	371,30 ± 41,67	373,26 ± 28,54	483,24 ± 107,35	262,01 ± 4,54	342,01 ± 2,21	313,39 ± 15,16
K_M (mM)	0,048 ± 0,016	0,046 ± 0,011	0,144 ± 0,062	0,044 ± 0,0034	0,153 ± 0,0148	0,277 ± 0,038

Efeito do pH sobre o K_M e a velocidade máxima do piruvato na atividade da LDH de músculo estriado de *Notothenia neglecta* e de *Prochilodus scropha*. Os precipitados 70% (P70%) obtidos como descrito em Métodos foram dialisados contra tampão fosfato 10mM, pH 6,5 , contendo β ME 1mM e glicerol 10%, por aproximadamente 15 horas em câmara fria. As preparações, assim obtidas foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 30 min, em centrífuga refrigerada K70D. Os sobrenadantes (D70%), contendo 10,67 e 15,40 mg/ml de proteína para *Notothenia neglecta* e *Prochilodus scropha*, respectivamente, foram utilizados para o presente estudo. Para as determinações de atividade foi utilizado sistema contendo tampão fosfato 0,1M, NADH+ H^+ 0,14 mM, 10 μ l de LDH em diluições adequadas, piruvato de sódio 0,02-2,5 mM, em diferentes pH 6,0, 7,0 e 8,0.

TABELA IV - Efeito da temperatura sobre o K_M e a velocidade máxima do piruvato na atividade da LDH de *Prochilodus scropha* e de *Notothenia neglecta*.

Parâmetros	<i>Prochilodus scropha</i>			<i>Notothenia neglecta</i>		
	Temperatura (°C)					
	10	20	30	10	20	30
Vmax (U/ml)	953,39 ± 19,44	1.423,05 ± 102,92	1.403,82 ± 110,10	569,39 ± 55,35	858,15 ± 81,40	975,06 ± 38,03
K _M (mM)	0,091 ± 0,006	0,13 ± 0,023	0,13 ± 0,029	0,24 ± 0,054	0,31 ± 0,062	0,33 ± 0,035

Efeito da temperatura sobre o K_M e a velocidade máxima do piruvato na atividade da LDH de músculo estriado de *Notothenia neglecta* e de *Prochilodus scropha*. Os precipitados 70% (P70%) obtidos como descrito em Métodos foram dialisados contra tampão fosfato 10mM, pH 6,5 , contendo β ME 1mM e glicerol 10% por aproximadamente 15 horas em câmara fria. Os materiais assim obtidos foram centrifugados a 10.000 rpm durante 30 min, em centrífuga refrigerada K70D. Os sobrenadantes (D70%), contendo 10,67 e 15,40 mg/ml de proteína para *Notothenia neglecta* e *Prochilodus scropha*, respectivamente, foram utilizados para o estudo, em meio contendo tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, NADH+ H^+ 0,14 mM, 10 μ l de LDH em diluições adequadas, piruvato de sódio 0,02-2,5 mM. O meio contendo LDH foi mantido durante 5 minutos nas diferentes temperaturas (10, 20 e 30 °C). A reação foi iniciada com a adição do piruvato e a leitura em espectrofotômetro, a 340 nm, nas temperaturas de estudo.

TABELA V - Efeito do oxamato de sódio sobre a atividade da LDH de *Prochilodus scropha* e de *Notothenia neglecta*.

Parâmetros	<i>Prochilodus scropha</i>		<i>Notothenia neglecta</i>	
	Oxamato 0,0 mM	Oxamato 0,5mM	Oxamato 0,0 mM	Oxamato 0,5 mM
V _{max} (U/ml)	418,80 ± 22,5	249,30 ± 11,40	358,90 ± 8,20	199,70 ± 9,00
K _M (mM)	0,089 ± 0,018	0,038 ± 0,009	0,094 ± 0,008	0,041 ± 0,009

Efeito do oxamato de sódio sobre a atividade da LDH de músculo estriado de *Prochilodus scropha* e de *Notothenia neglecta*. Os precipitados 70% (P70%) obtidos como descrito em Métodos foram dialisados contra tampão fosfato 10mM, pH 6,5 , contendo βME 1mM e glicerol 10% por aproximadamente 15 horas em câmara fria. Os materiais assim obtidos foram centrifugados a 10.000 rpm durante 30 min, em centrífuga refrigerada K70D. Os sobrenadantes contendo a fração D70%, de *Prochilodus scropha* e de *Notothenia neglecta*, foram utilizados para o estudo de efeito do oxamato de sódio 0,5 mM nas diferentes concentrações de piruvato (0,05-2,5 mM) em meio contendo tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 , NADH+ H⁺ 0,14 mM e 10 µl de LDH em diluições adequadas. Foram utilizadas alíquotas de 10 µl da preparação contendo, 15,40 e 10,67 mg/ml de proteína para *Prochilodus scropha* e *Notothenia neglecta*, respectivamente.

TABELA VI - Efeito do oxalato de sódio sobre a atividade da LDH de *Prochilodus scropha* e de *Notothenia neglecta*.

Parâmetros	<i>Prochilodus scropha</i>		<i>Notothenia neglecta</i>	
	Oxalato 0,0 mM	Oxalato 0,5mM	Oxalato 0,0 mM	Oxalato 0,5 mM
V _{max} (U/ml)	364,12 ± 56,74	299,37 ± 11,67	269,07 ± 17,96	131,82 ± 15,86
K _M (mM)	0,041 ± 0,022	0,045 ± 0,007	0,128 ± 0,028	0,11 ± 0,037

Efeito do oxalato de sódio sobre a atividade da LDH de músculo estriado de *Notothenia neglecta* e de *Prochilodus scropha*. Os precipitados 70% (P70%) obtidos como descrito em Métodos foram dialisados contra tampão fosfato 10mM, pH 6,5, contendo βME 1mM e glicerol 10% por aproximadamente 15 horas em câmara fria. Os materiais assim obtidos foram centrifugados a 10.000 rpm durante 30 min, em centrífuga refrigerada K70D. Os sobrenadantes contendo a fração D70%, de *Notothenia neglecta* e de *Prochilodus scropha*, respectivamente, foram utilizados para o estudo de efeito do oxalato de sódio 0,5 mM nas diferentes concentrações de piruvato (0,05-2,5 mM) em meio contendo tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, NADH+ H⁺ 0,14 mM e 10 µl de LDH em diluições adequadas. Foram utilizadas alíquotas de 10 µl da preparação contendo, 15,40 e 10,67 mg/ml de proteína para *Prochilodus scropha* e *Notothenia neglecta*, respectivamente.

TABELA VII - Efeito do APAD sobre a atividade da LDH de *Prochilodus scropha* e de *Notothenia neglecta*.

Parâmetros	<i>Prochilodus scropha</i>		<i>Notothenia neglecta</i>	
	APAD 0,0 mM	APAD 1,0 mM	APAD 0,0 mM	APAD 1,0 mM
V _{max} (U/ml)	288,80 ± 9,10	173,20 ± 32,00	293,50 ± 141,90	66,80 ± 12,90
K _M (mM)	0,029 ± 0,006	0,19 ± 0,10	0,68 ± 0,492	0,12 ± 0,63

Efeito do APAD sobre a atividade da LDH de músculo estriado de *Notothenia neglecta* e de *Prochilodus scropha*. Os precipitados 70% (P70%) obtidos como descrito em Métodos foram dialisados contra tampão fosfato 10mM, pH 6,5 , contendo βME 1mM e glicerol 10% por aproximadamente 15 horas em câmara fria. Os materiais assim obtidos foram centrifugados a 10.000 rpm durante 30 min, em centrifuga refrigerada K70D. Os sobrenadantes contendo a fração D70%, de *Prochilodus scropha* e de *Notothenia neglecta*, foram utilizados para o estudo de efeito do APAD 1,0 mM nas diferentes concentrações de piruvato (0,05-2,5 mM) em meio contendo tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 , NADH+ H⁺ 0,14 mM e 10 µl de LDH em diluições adequadas. Foram utilizadas alíquotas de 10 µl da preparação contendo, 15,40 e 10,67 mg/ml de proteína para *Prochilodus scropha* e *Notothenia neglecta*, respectivamente.

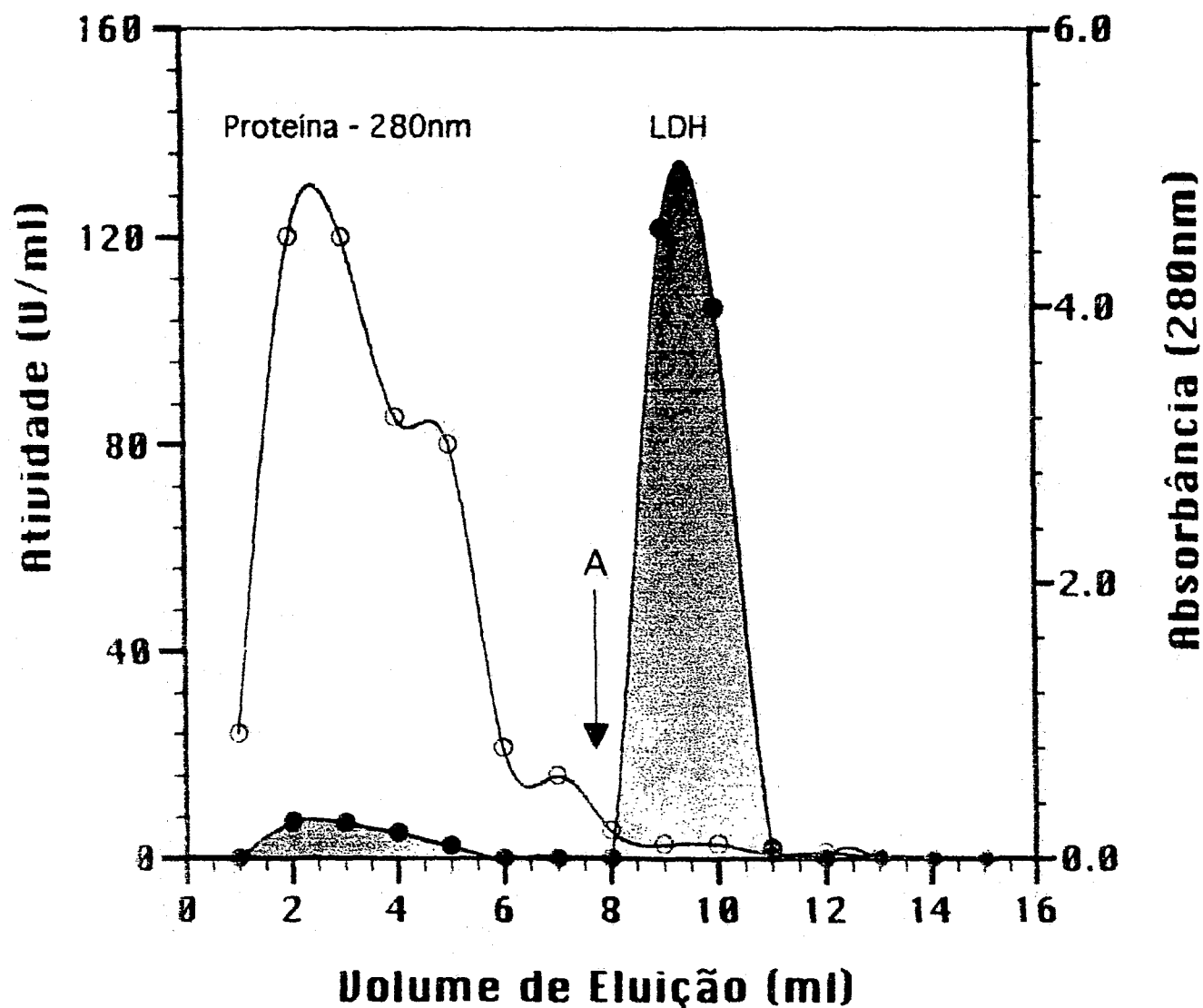


Fig. 1 - Perfil cromatográfico da lactato desidrogenase de músculo estriado de *Prochilodus scropha* em oxamato de agarose. A coluna de oxamato-agarose foi equilibrada com tampão fosfato 0,02M, pH 6,8 , contendo NaCl 0,5M e NADH⁺H⁺ 0,2mM. O extrato bruto obtido apartir do tampão de extração fosfato 0,02M, pH 6,8 , contendo NaCl 0,5M foi adicionado de NaCl 0,5M e NADH H⁺ 0,2mM contendo 20,77 mg/ml de proteína e aplicado à coluna. A eluição foi levada a efeito no mesmo Tampão sem NADH⁺H⁺ (A), acompanhada de leituras de absorbância a 280 nm e a atividade enzimática medida de acordo com o procedimento descrito em Métodos.

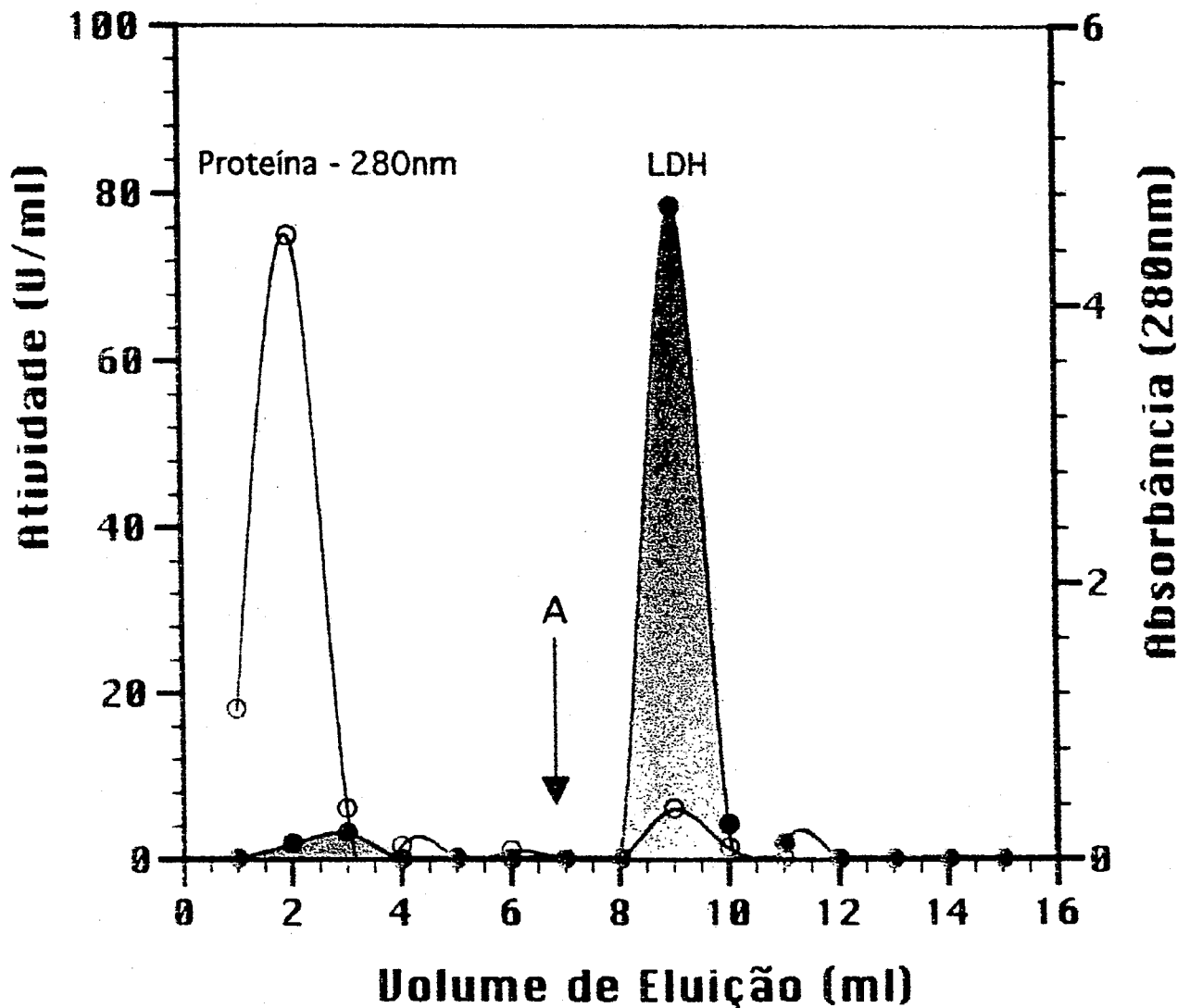


Fig. 2 - Perfil cromatográfico da lactato desidrogenase de músculo estriado de *Notothenia neglecta* em oxamato de agarose. A coluna de oxamato-agarose foi equilibrada com tampão fosfato 0,02M, pH 6,8 , contendo NaCl 0,5M e NADH^+H^+ 0,2mM. O extrato bruto obtido apartir do tampão de extração fosfato 0,02M, pH 6,8 , contendo NaCl 0,5M foi adicionado de NaCl 0,5M e NADH^+H^+ 0,2mM contendo 33,298 mg/ml de proteína e aplicado à coluna. A eluição foi levada a efeito no mesmo tampão sem NADH^+H^+ (A), acompanhada de leituras de absorbância a 280 nm e a atividade enzimática medida de acordo com o procedimento descrito em Métodos.

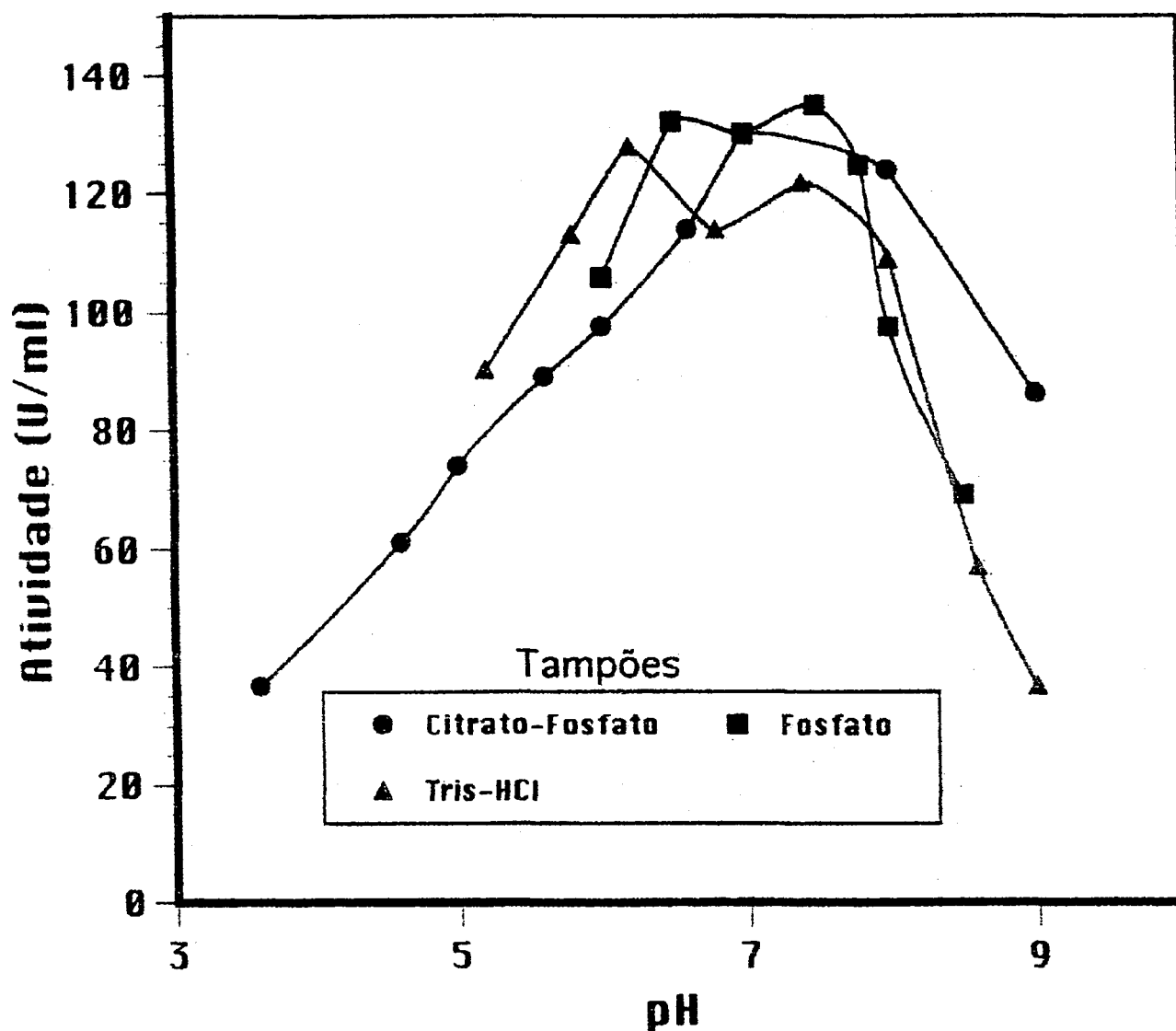


Fig. 3 - Efeito do pH na atividade da lactato desidrogenase de músculo estriado de *Prochilodus scropha*. O meio de reação continha NADH + H⁺ 0,14 mM e piruvato de sódio 1,0 mM nos seguintes tampões: tampão fosfato 0,2 M em pH variando de 6,0 a 8,5, tampão TRIS-HCl 0,2 M em pH de 5,2 a 9,0 e tampão citrato-fosfato 0,1 M em pH variando de 3,6 a 7,0. A reação foi iniciada pela adição de 10 µl da preparação de LDH, contendo 30,18 mg/ml de proteína. A velocidade da oxidação do NADH + H⁺ foi acompanhada a 340 nm, em espectrofotômetro, BECKMAN DU 640, à temperatura de 25 ± 2,0 °C.

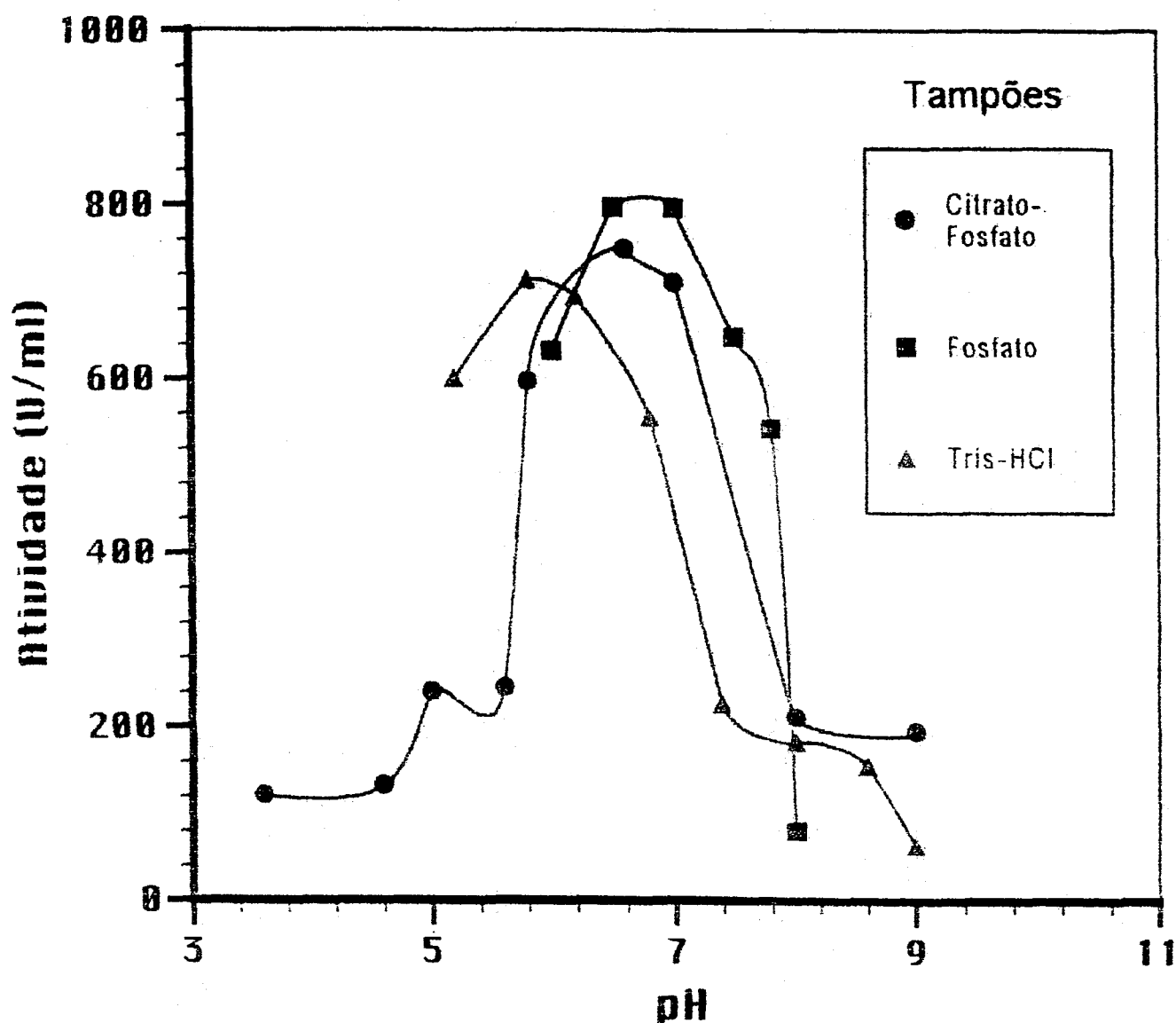


Fig. 4 - Efeito do pH na atividade da lactato desidrogenase de músculo estriado de *Notothenia neglecta*. O meio de reação continha NADH + H⁺ 0,14 mM e piruvato de sódio 1,0 mM em um dos seguintes tampões: tampão fosfato 0,2 M, em pH variando de 6,0 a 8,5, tampão TRIS-HCl 0,2 M, em pH variando de 5,2 a 9,0 e tampão citrato-fosfato 0,1 M, em pH variando de 3,6 a 7,0. A reação foi iniciada pela adição de 10 µl da preparação de LDH, contendo 10,77 mg/ml de proteína. A velocidade da oxidação do NADH + H⁺ foi acompanhada a 340 nm, em espectrofotômetro BECKMAN DU 640, a temperatura de 8,0 ± 2,0 °C.

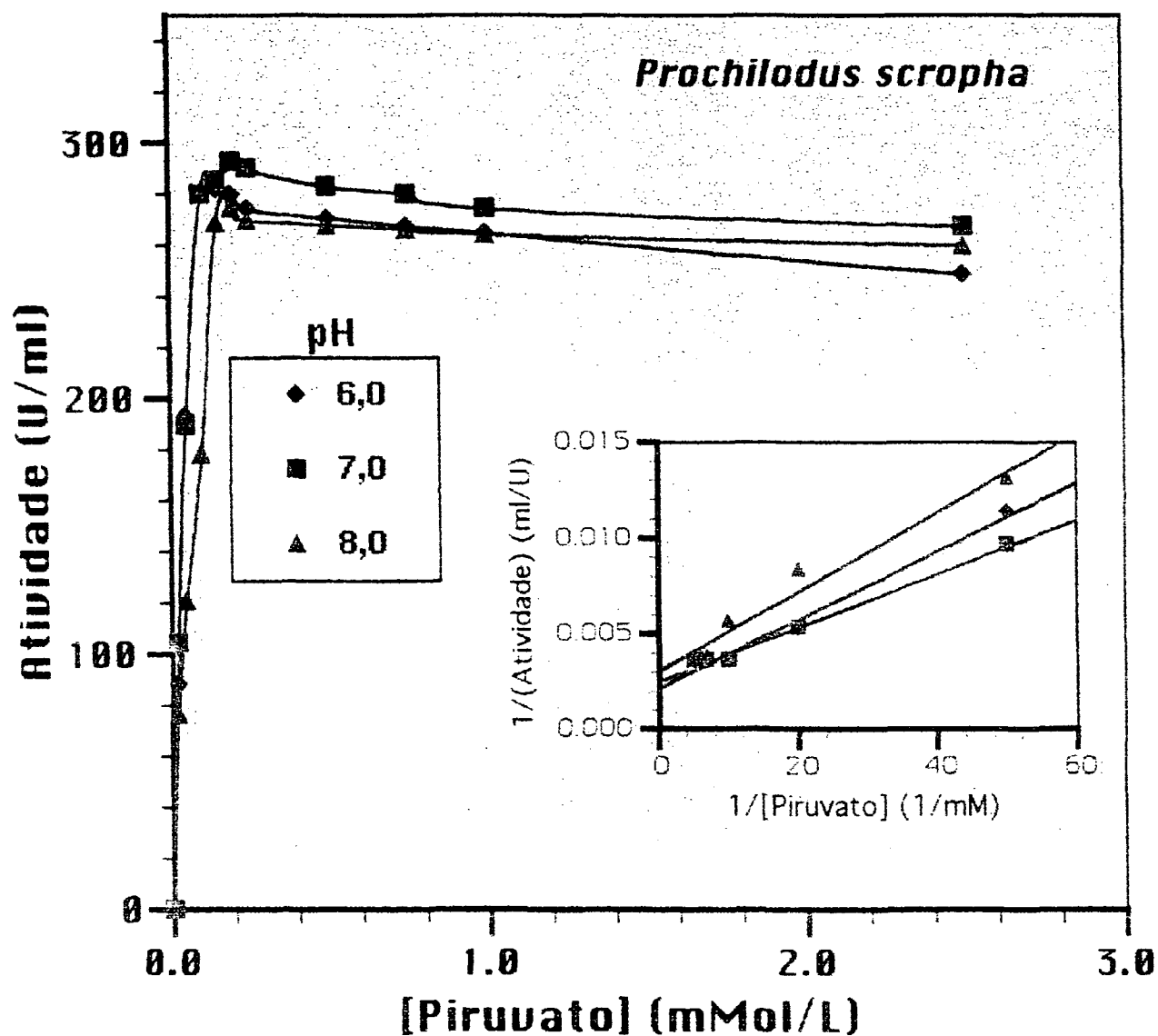


Fig. 5 – Estudo do efeito do pH sobre a velocidade da ação enzimática e o K_m da LDH de músculo estriado de *Prochilodus scropha*. O meio de reação (1,0 ml) continha tampão fosfato 0,1 M, NADH + H^+ 0,14 mM, piruvato de sódio 0,05-2,5 mM em pH 6,0, 7,0 e 8,0. A reação foi iniciada pela adição de 10 μ l da preparação de LDH contendo 25,207 mg/ml de proteína. A velocidade da reação foi seguida a 340 nm em espectrofotômetro BECKMAN DU 640, pela oxidação do NADH + H^+ , a $25,0 \pm 2,0^\circ C$.

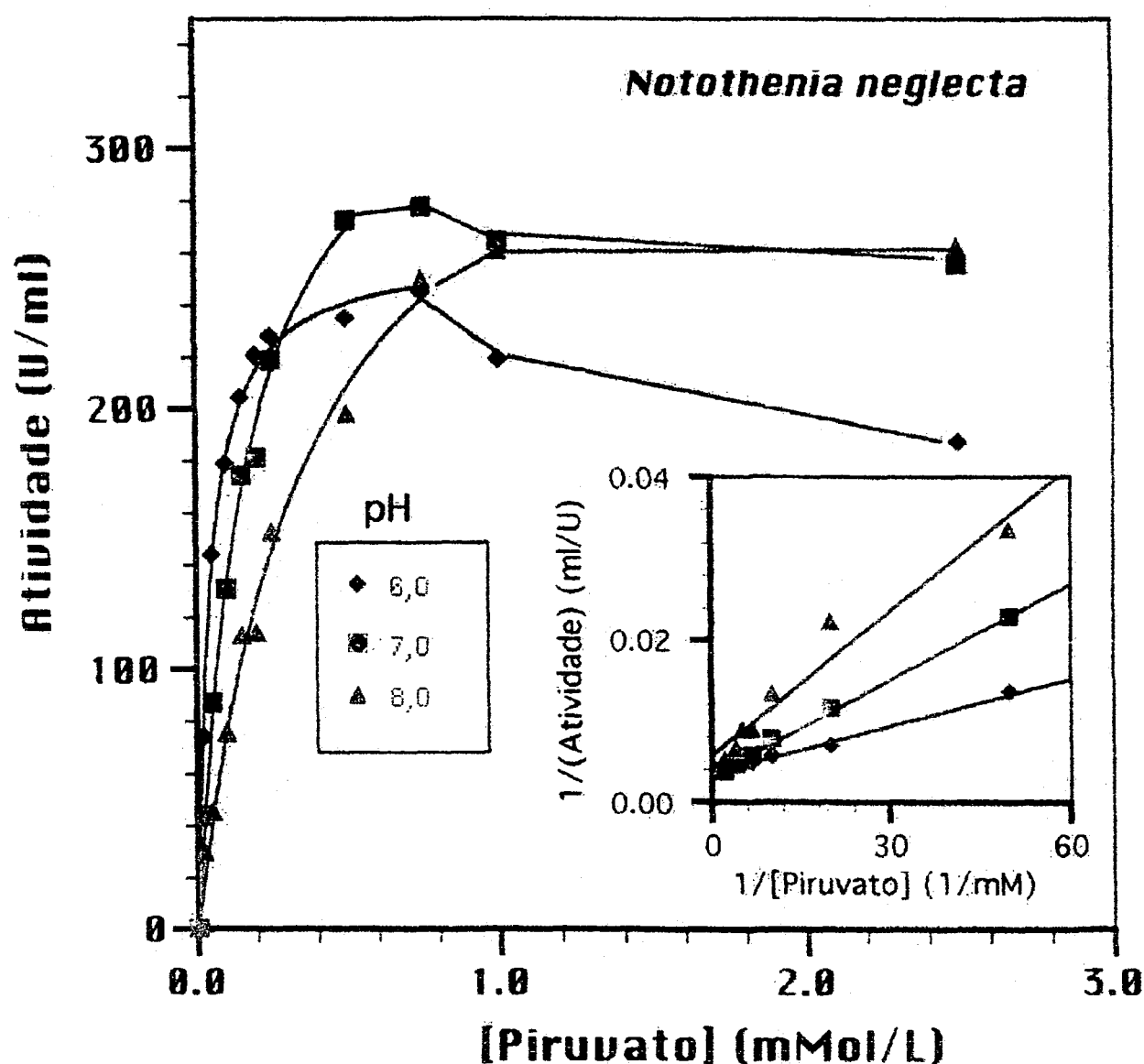


Fig. 6 – Estudo do efeito do pH sobre a velocidade da ação enzimática e o K_m da LDH de músculo estriado de *Notothenia neglecta*. O meio de reação (1,0 ml) continha tampão fosfato 0,1 M, NADH + H^+ 0,14 mM, piruvato de sódio 0,05-2,5 mM em pH 6,0, 7,0 e 8,0. A reação foi iniciada pela adição de 10 μ l da preparação de LDH contendo 10,67 mg/ml de proteína. A velocidade da reação foi seguida a 340 nm em espectrofotômetro BECKMAN DU 640, pela oxidação do NADH + H^+ , a $8,0 \pm 2,0^\circ C$.

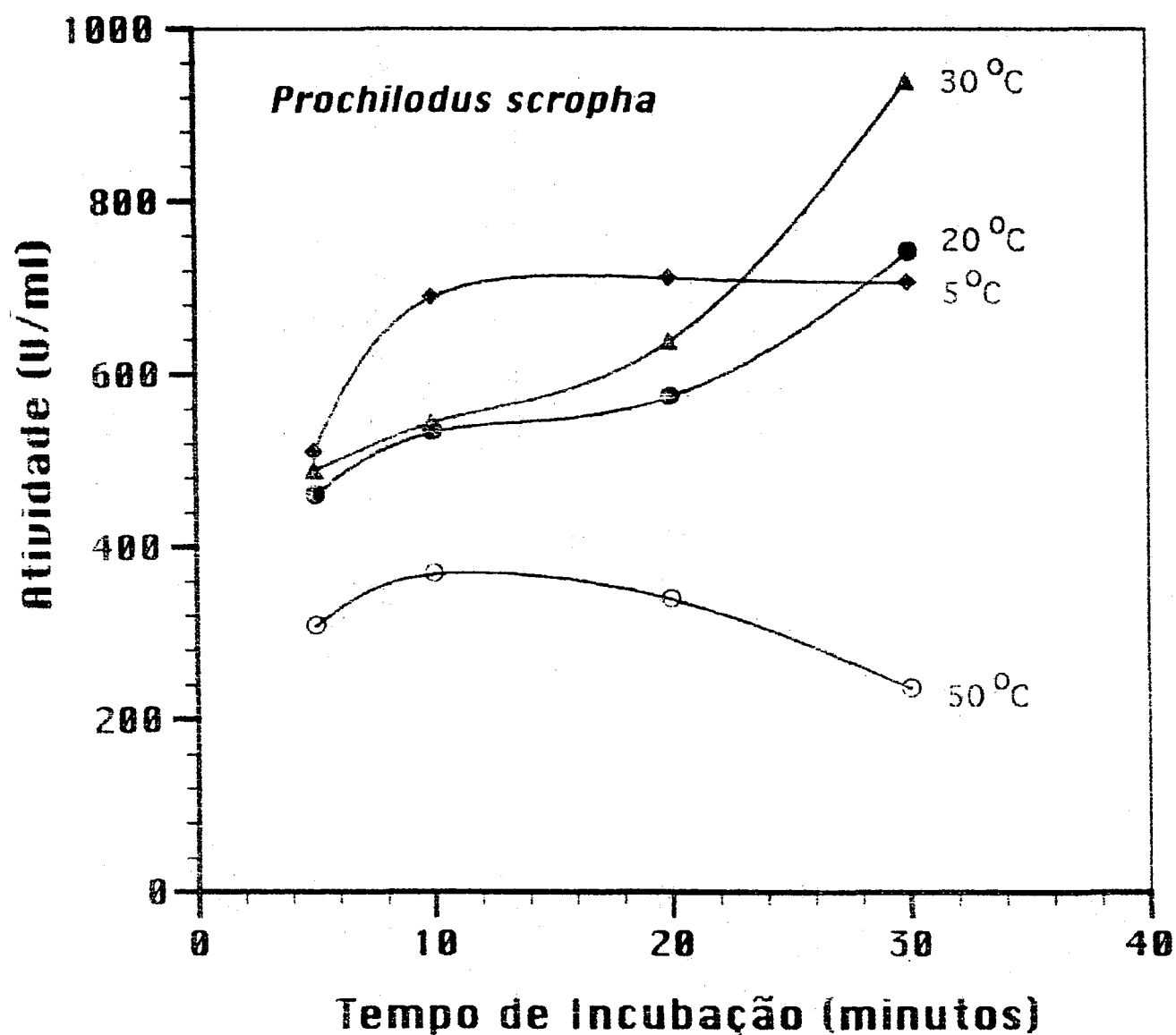


Fig. 7 - Estabilidade da LDH de músculo estriado de *Prochilodus scropha* em função da temperatura. O meio de reação (1ml) continha tampão fosfato 0,1M, piruvato de sódio 1,0 mM, NADH + H⁺ 0,14mM em pH 7,4. A reação foi iniciada pela adição de 10 µl da preparação de LDH pré-incubada às temperaturas de 5, 20, 30 e 50 °C por 5, 10, 20 e 30 min. A velocidade da reação foi seguida a 340 nm em espectrofotômetro BECKMAN DU 640, pela oxidação do NADH + H⁺ a $25,0 \pm 2,0$ °C.

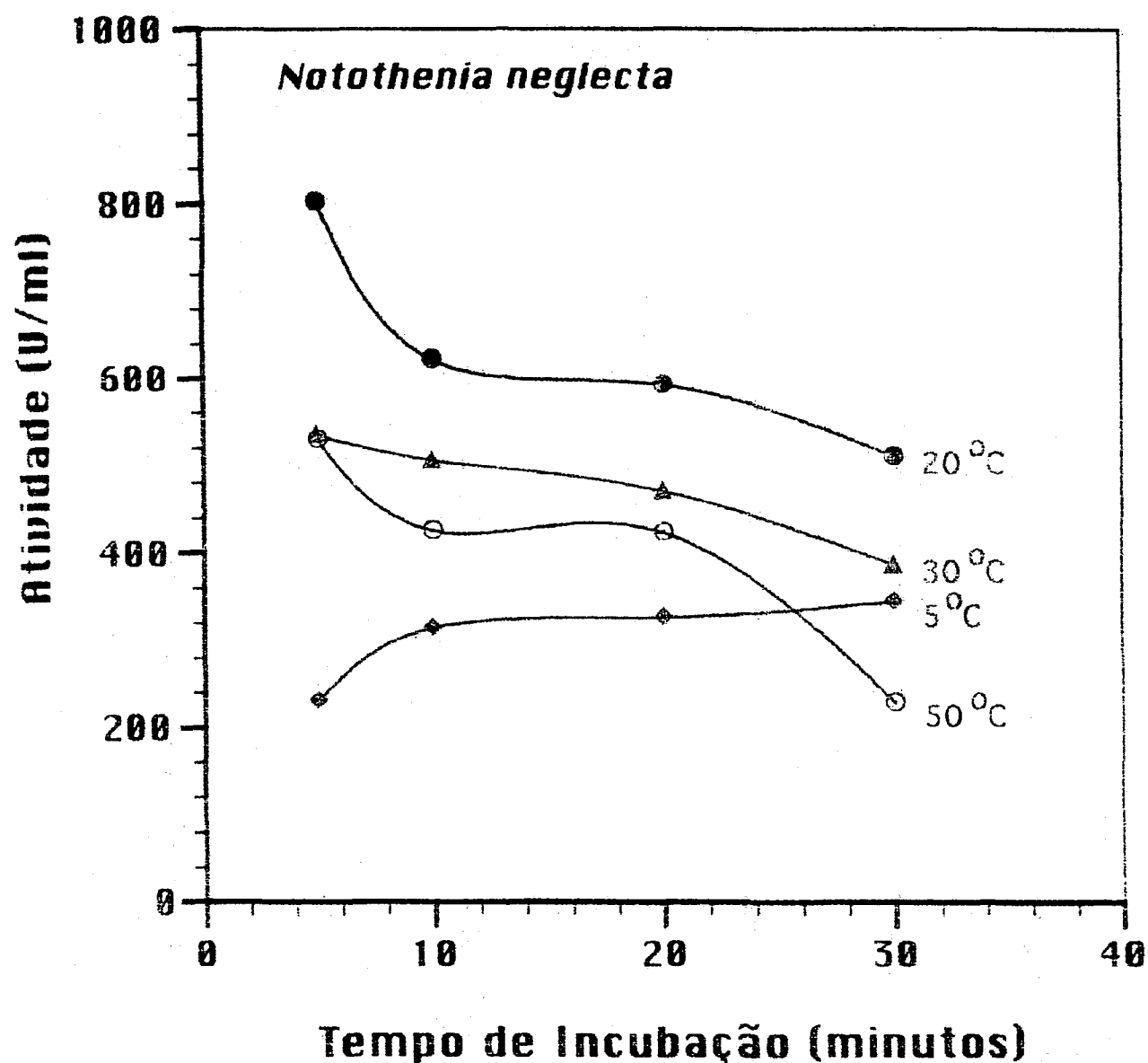


Fig. 8 - Estabilidade da LDH de músculo estriado de *Notothenia neglecta* em função da temperatura. O meio de reação (1ml) continha tampão fosfato 0,1M, piruvato de sódio 1,0 mM, NADH + H⁺ 0,14mM em pH 7,4. A reação foi iniciada pela adição 10 µl da preparação de LDH pré-incubada às temperaturas de 5, 20, 30 e 50 °C por 5, 10, 20 e 30 min. A velocidade da reação foi seguida a 340 nm em espectrofotômetro BECKMAN DU 640, pela oxidação do NADH+ H⁺, a $8,0 \pm 2,0$ °C.

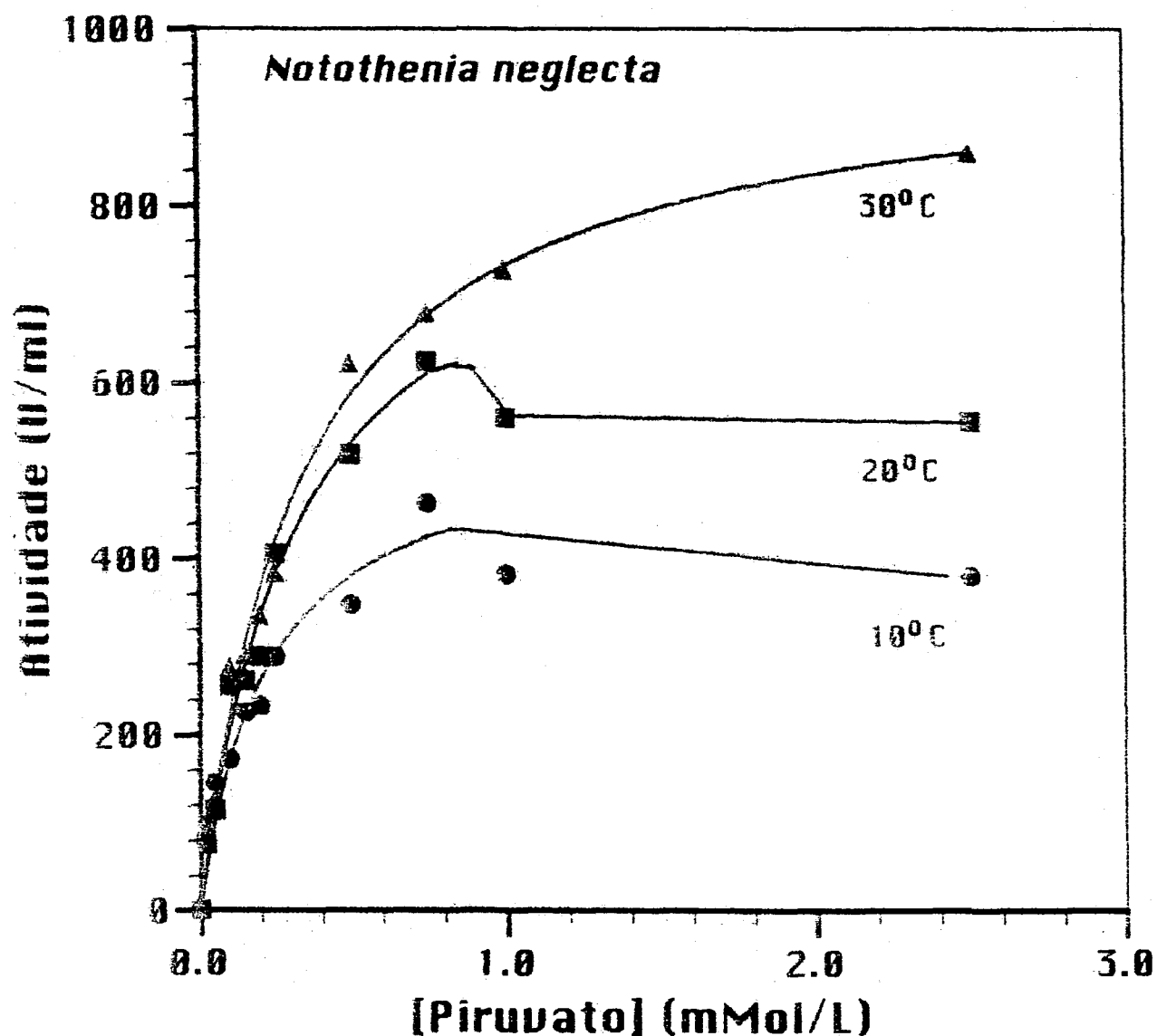


Fig. 9 - Efeito da temperatura sobre a velocidade da ação enzimática e o K_m da LDH de músculo estriado de *Notothenia neglecta*. O meio de reação (1ml) continha tampão fosfato 0,1 M, piruvato de sódio 0,05 - 2,5 mM, NADH + H^+ 0,14 mM, pH 7,4. A reação foi iniciada pela adição de 10 μ l da preparação de LDH, contendo 10,67 mg/ml de proteína, pré-incubada às temperaturas de 10, 20 e 25°C por 20 min. A velocidade da reação foi seguida a 340 nm em espectrofotômetro BECKMAN DU 640, pela oxidação do NADH + H^+ , a temperatura de $8,0 \pm 2,0$ °C.

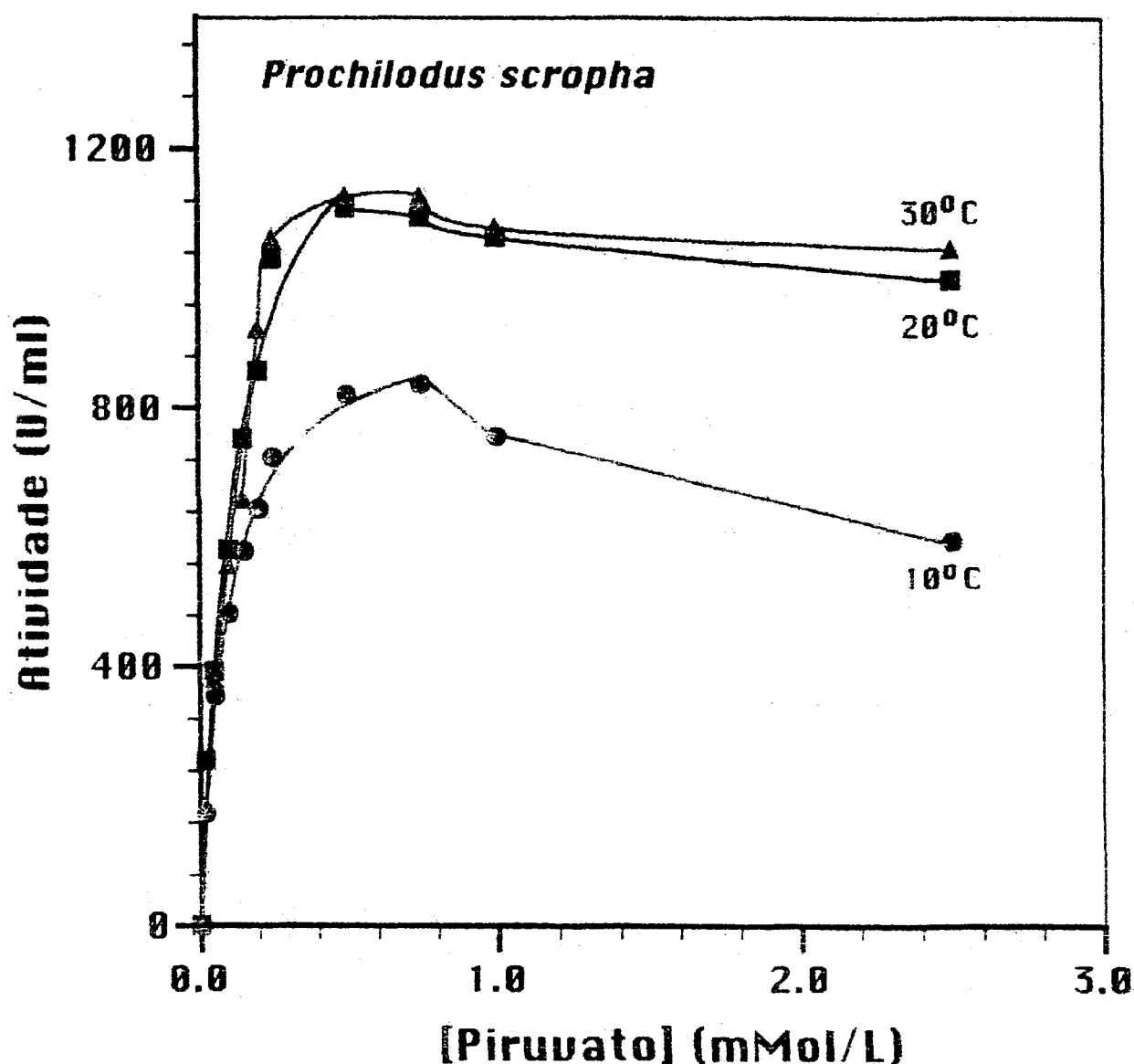


Fig. 10 - Efeito da temperatura sobre a velocidade da ação enzimática e o K_m da LDH de músculo estriado de *Prochilodus scropha*. O meio de reação (1ml) continha tampão fosfato 0,1 M, piruvato de sódio 0,05 - 2,5 mM, NADH + H^+ 0,14 mM, pH 7,4. A reação foi iniciada pela adição de 10 μ l da preparação de LDH, contendo 15,40 mg/ml de proteína, pré-incubada às temperaturas de 10, 20 e 25 $^{\circ}$ C por 20 min. A velocidade da reação foi seguida a 340 nm em espectrofotômetro BECKMAN DU 640, pela oxidação do NADH + H^+ , a temperatura de $25,0 \pm 2,0$ $^{\circ}$ C.

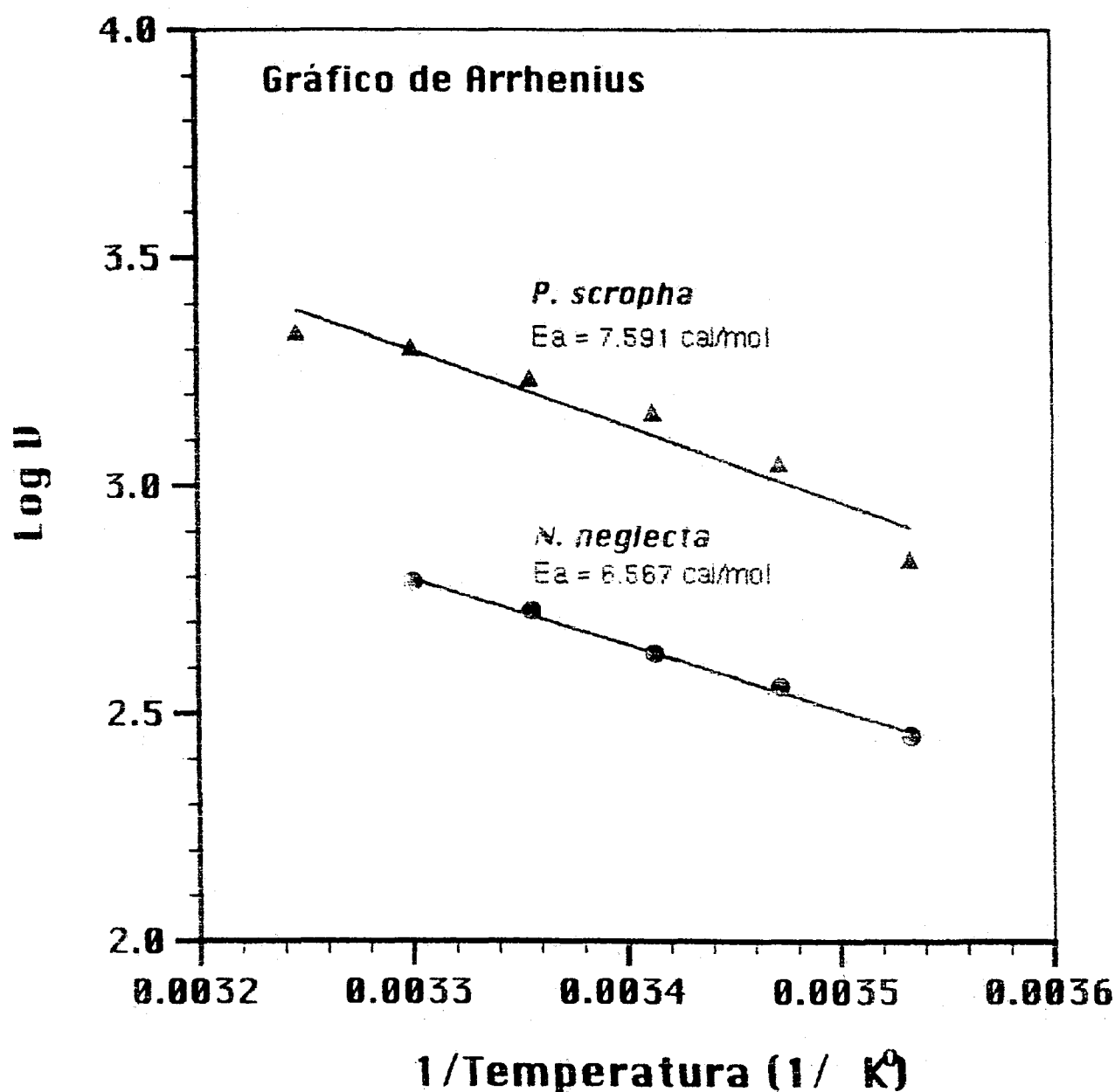


Fig. 11 - Determinação da Energia de Ativação da LDH de Músculo Estriado de *Prochilodus scropha* e de *Notothenia neglecta*. A atividade da LDH foi medida em meio de reação contendo tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, NADH + H⁺ 0,14 mM, 10 µl da preparação de LDH – contendo 15,40 e 10,67 mg de proteína/ml, respectivamente para *Prochilodus scropha* e *Notothenia neglecta* e incubado nas temperaturas de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50°C por 5 minutos. A reação foi iniciada pela adição de piruvato de sódio (50mM) ao meio de reação para obter a concentração final de 1,0 mM. A velocidade da reação foi seguida a 340 nm em espectrofotômetro BECKMAN DU 640, pela oxidação do NADH + H⁺ nas temperaturas indicadas.

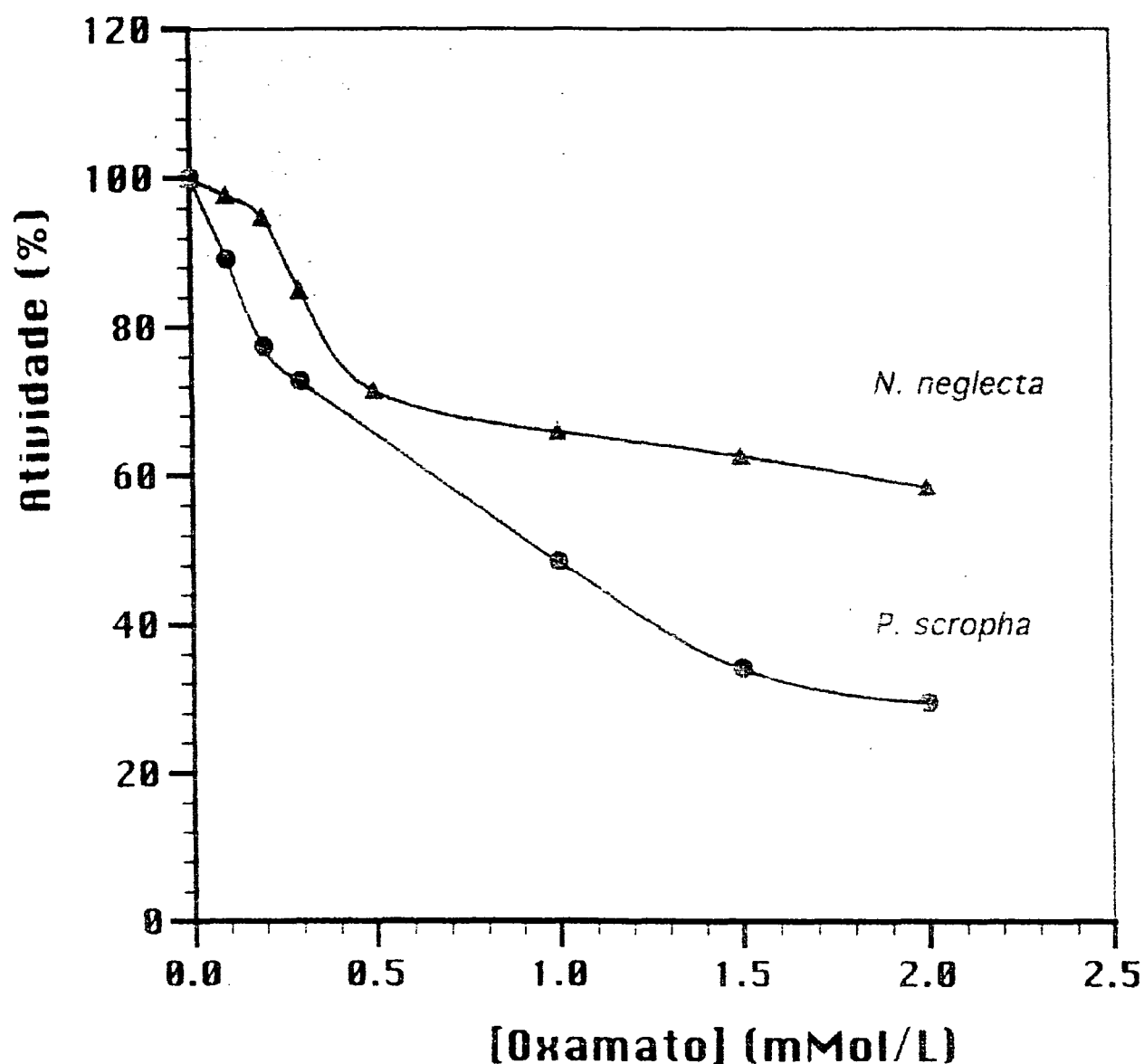


Fig. 12 - Efeito do oxamato de sódio sobre a atividade da LDH de músculo estriado de *Prochilodus scropha* e de *Notothenia neglecta*. Os precipitados 70% (70%) obtidos como descrito em Métodos foram dialisados contra tampão fosfato 10mM, pH 6,5, contendo β ME 1mM e glicerol 10% por aproximadamente 15 horas em câmara fria. As preparações assim obtidas foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 30 min, em centrífuga refrigerada K70D. Os sobrenadante (D70%) contendo 15,40 e 10,67 mg/ml de proteínas para *Prochilodus scropha* e *Notothenia neglecta*, respectivamente, foram utilizados para o estudo de efeito do oxamato de sódio, em diferentes concentrações, como descrito em Métodos.

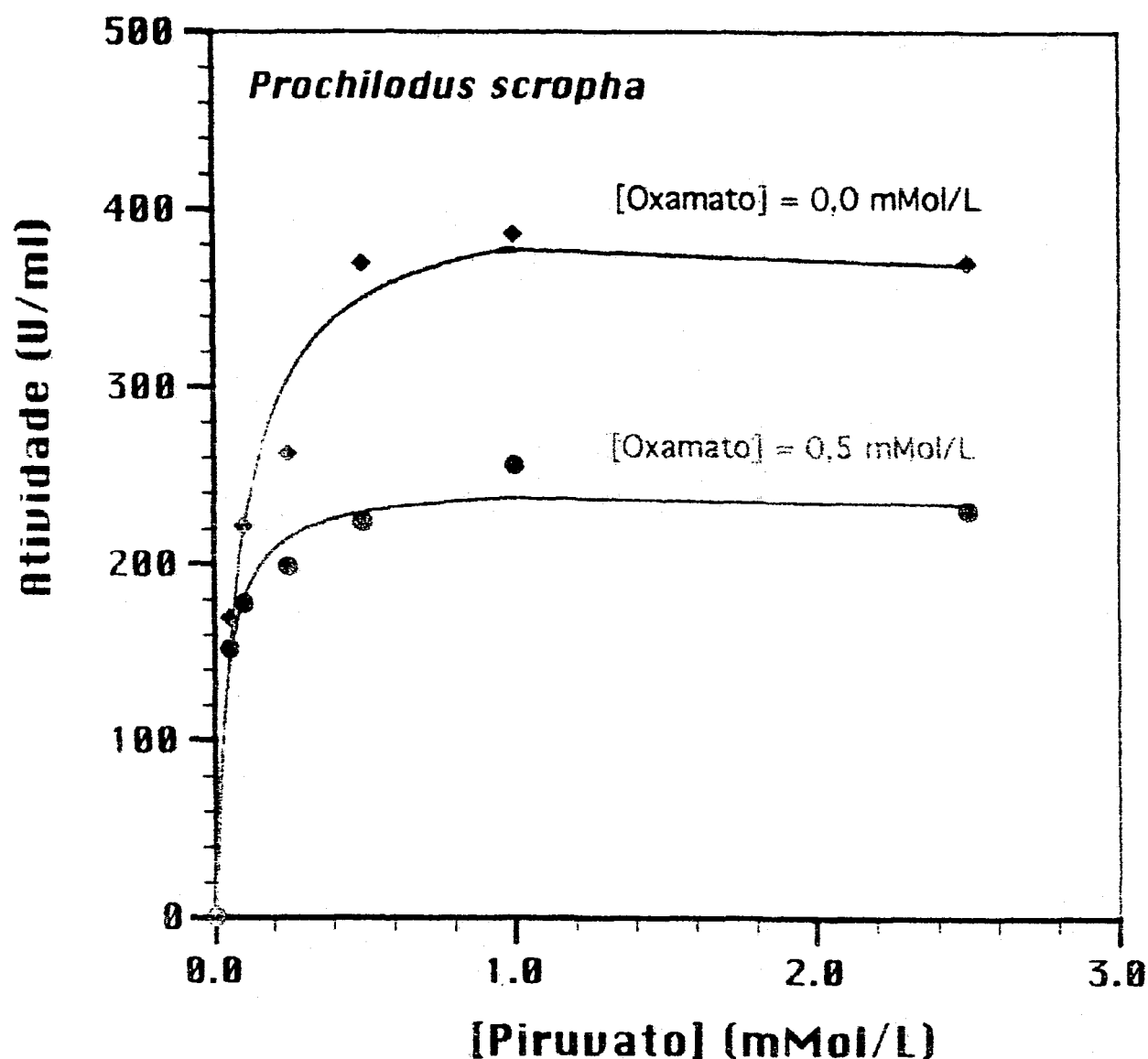


Fig. 13 - Efeito do piruvato e do oxamato de sódio sobre a atividade da LDH de músculo estriado de *Prochilodus scropha* O precipitado 70% (P70%) obtido como descrito em Métodos foi dialisado contra Tampão fosfato 10mM, pH 6,5 contendo β ME 1mM e glicerol 10% por aproximadamente 15 horas em câmara fria. A preparação assim obtida foi centrifugada a 10.000 rpm durante 30 min, em centrífuga refrigerada K70D. O sobrenadante (D70%) contendo 15,40 mg/ml de proteína foi utilizado para o estudo de efeito do oxamato de sódio 0,5mM em diferentes concentrações de piruvato , como descrito em Métodos.

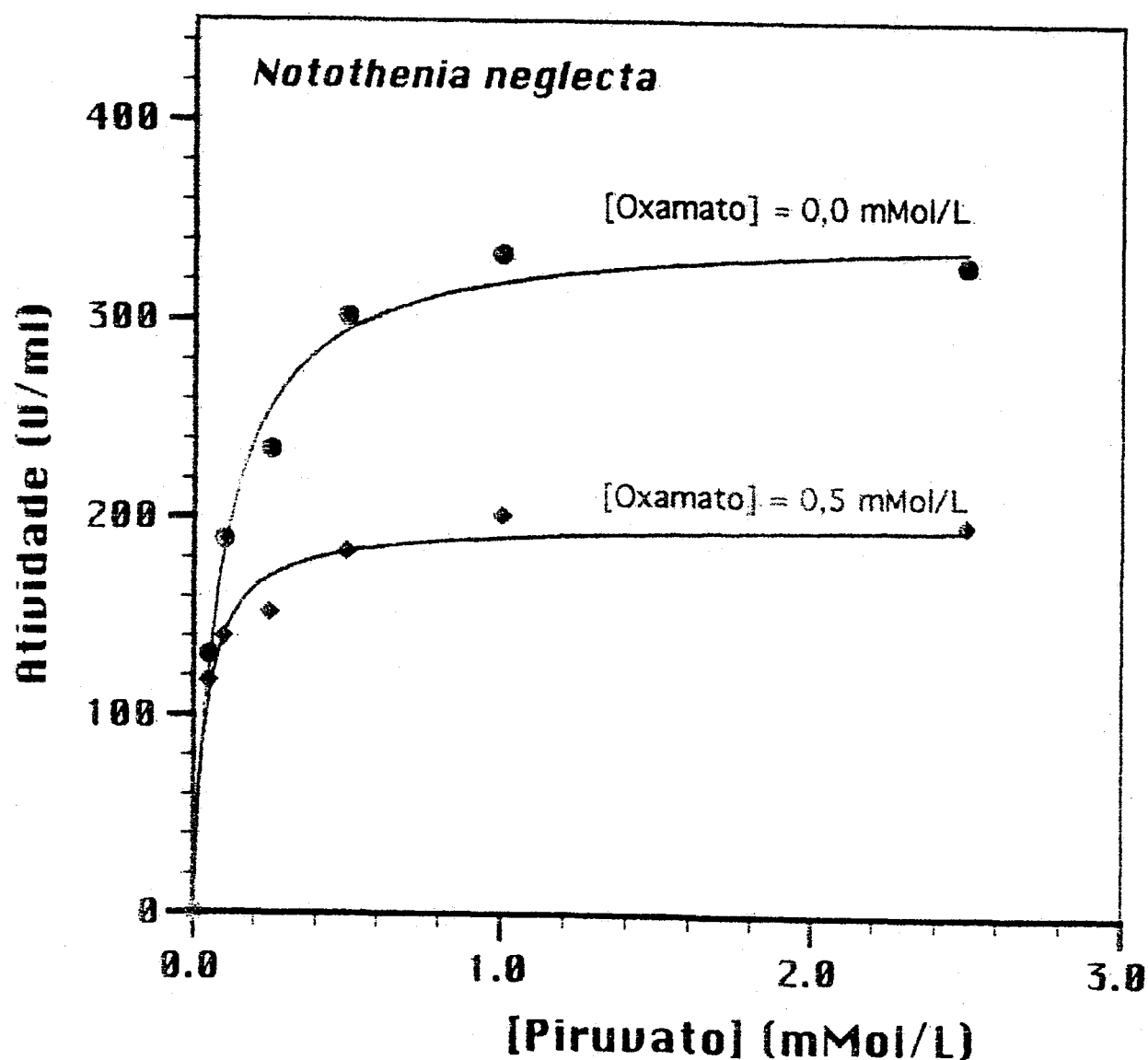


Fig. 14 - Efeito do piruvato e do oxamato de sódio sobre a atividade da LDH de músculo estriado de *Notothenia neglecta*. O precipitado 70% (P70%) obtido como descrito em Métodos foi dialisado contra tampão fosfato 10mM, pH 6,5 , contendo β ME 1mM e glicerol 10% por aproximadamente 15 horas em câmara fria. A preparação assim obtida foi centrifugada a 10.000 rpm durante 30 min, em centrífuga refrigerada K70D. O sobrenadante (D70%) contendo 10,67 mg/ml de proteína foi utilizado para o estudo de efeito do oxamato de sódio 0,5 mM em diferentes concentrações de piruvato, como descrito em Métodos.

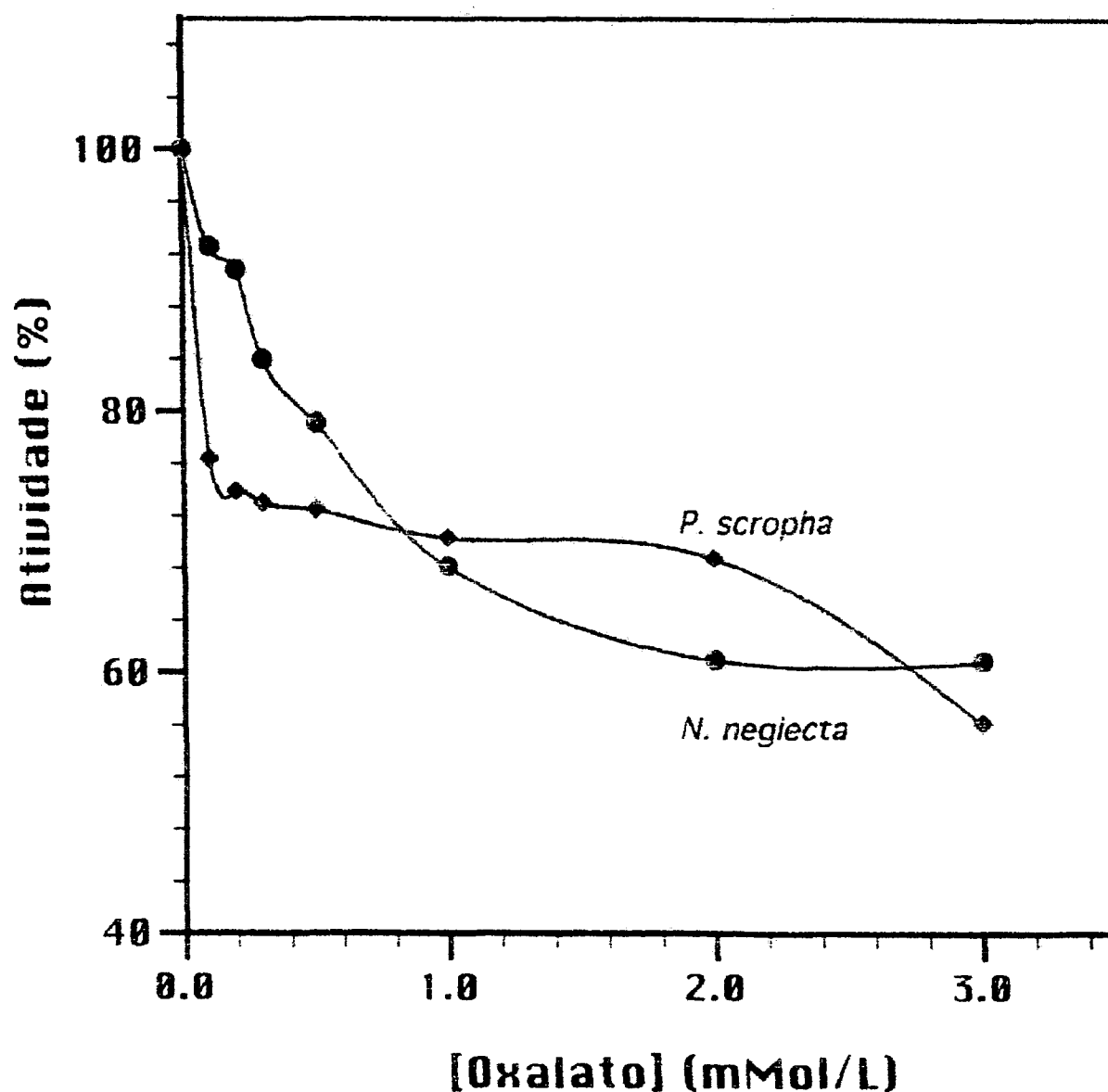


Fig. 15 - Efeito do oxalato de sódio sobre a atividade da LDH de músculo estriado de *Prochilodus scropha* e de *Notothenia neglecta*. Os precipitados 70% (P70%) obtidos como descrito em Métodos foram dialisados contra tampão fosfato 10mM, pH 6,5, contendo β ME 1mM e glicerol 10% por aproximadamente 15 horas em câmara fria. As preparações assim obtidas foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 30 min, em centrífuga refrigerada K70D. Os sobrenadantes (D70%) contendo 15,40 e 10,66 mg/ml de proteína para *Prochilodus scropha* e de *Notothenia neglecta*, respectivamente, foram utilizados para o estudo de efeito do oxalato de sódio em diferentes concentrações, como descrito em Métodos.

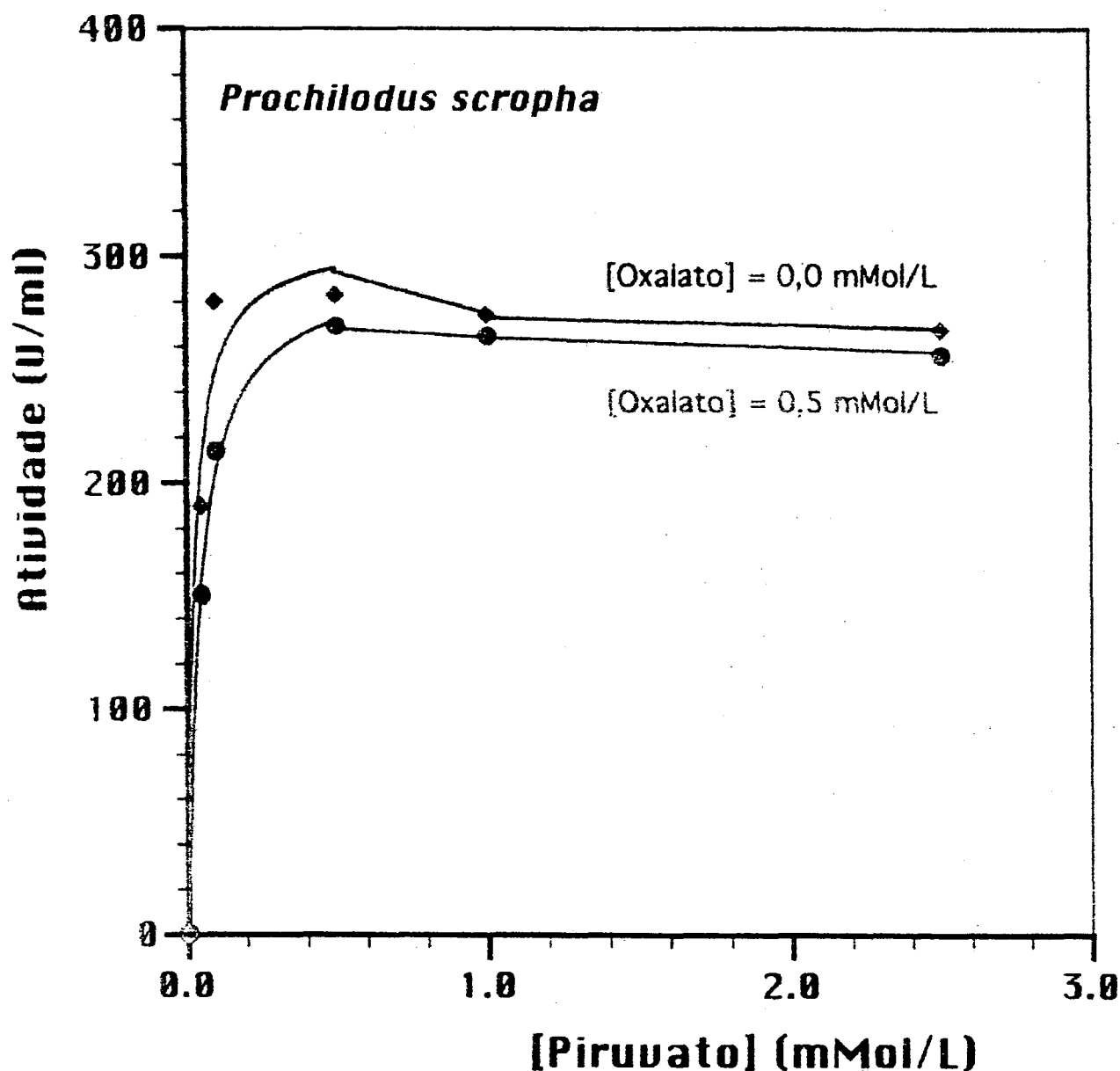


Fig. 16 - Efeito do piruvato e do oxalato de sódio sobre a atividade da LDH de músculo estriado de *Prochilodus scropha*. O precipitado 70% (P70%) obtido como descrito em Métodos foi dialisado contra tampão fosfato 10mM, pH 6,5 , contendo β ME 1mM e glicerol 10% por aproximadamente 15 horas em câmara fria. A preparação assim obtida foi centrifugada a 10.000 rpm durante 30 min, em centrífuga refrigerada K70D. O sobrenadante (D70%) contendo 15,40 mg/ml de proteína foi utilizado para o estudo de efeito do oxalato de sódio 0,5 mM em diferentes concentrações de piruvato, como descrito em Métodos.

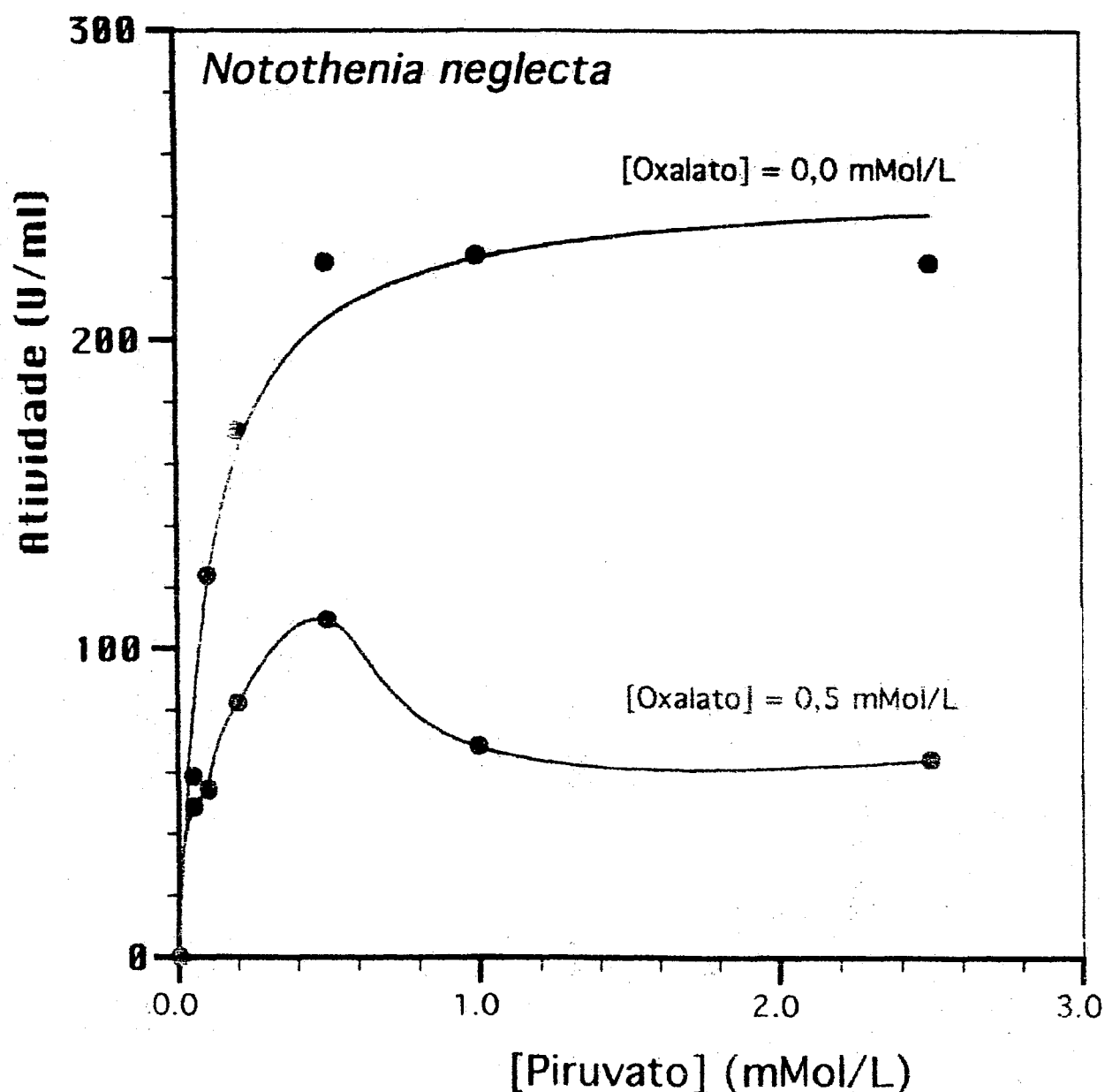


Fig. 17 - Efeito do piruvato e do oxalato de sódio sobre a atividade da LDH de músculo estriado de *Notothenia neglecta*. O precipitado 70% (P70%) obtido como descrito em Métodos foi dialisado contra tampão fosfato 10mM, pH 6,5 , contendo β ME 1mM e glicerol 10% por aproximadamente 15 horas em câmara fria. A preparação assim obtida foi centrifugada a 10.000 rpm durante 30 min, em centrífuga refrigerada K70D. O sobrenadante (D70%) contendo 10,67 mg/ml de proteína foi utilizado para o estudo de efeito do oxalato de sódio 0.5 mM em diferentes concentrações de piruvato, como descrito em Métodos.

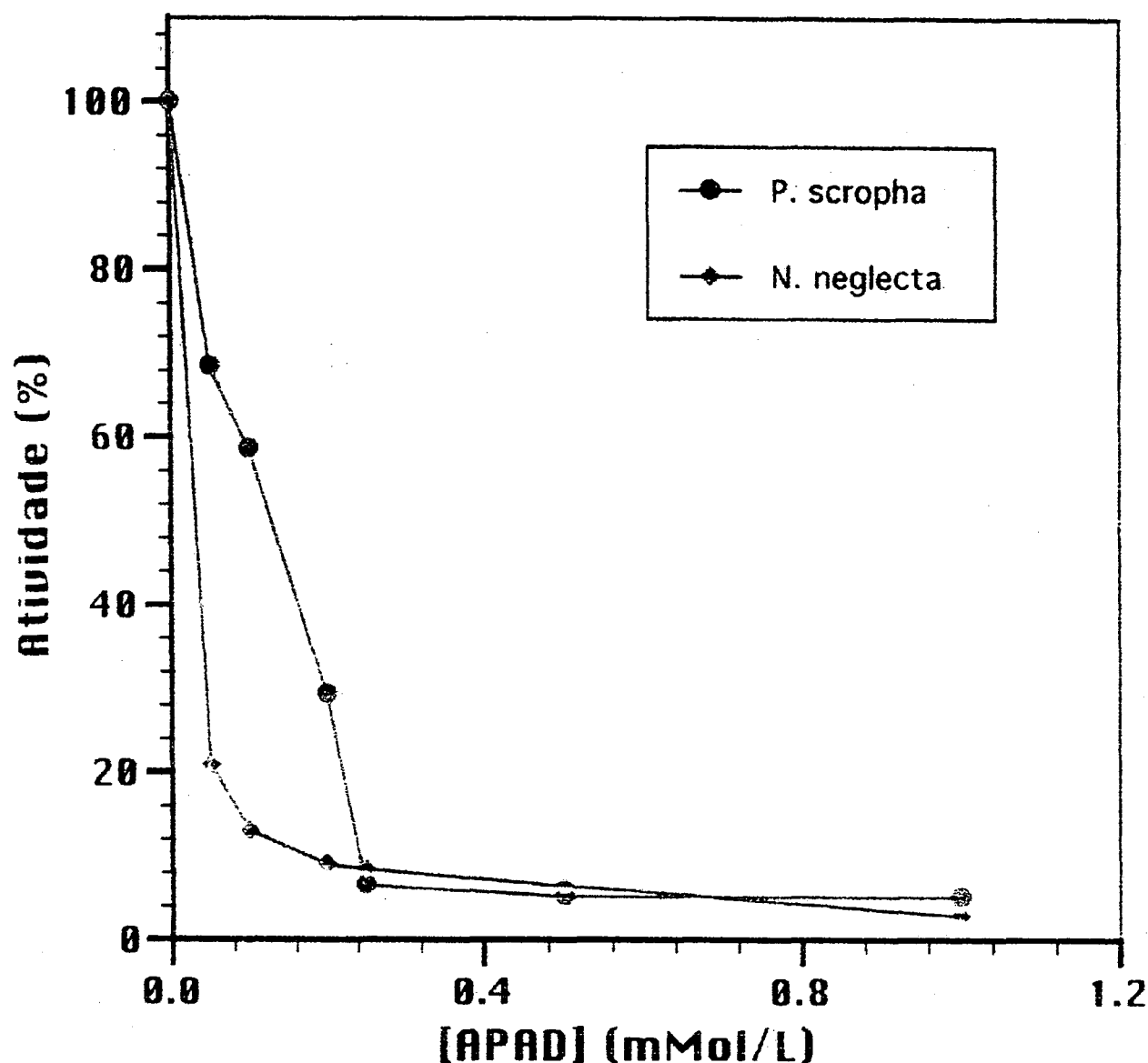


Fig. 18 - Efeito do APAD (3-acetil piridina-adenina dinucleotídeo) sobre a atividade da LDH de músculo estriado de *Prochilodus scropha* e de *Notothenia neglecta*. Os precipitados 70% (P70%) obtidos como descritos em Métodos foram dialisados contra tampão fosfato 10mM, pH 6,5 , contendo β ME 1mM e glicerol 10% por aproximadamente 15 horas em câmara fria. As prepações assim obtidas foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 30 min, em centrífuga refrigerada K70D. Os sobrenadantes (D70%) contendo 15,40 e 10,67 mg/ml de proteínas foram utilizados para o estudo do efeito do APAD em diferentes concentrações, como descrito em Métodos.

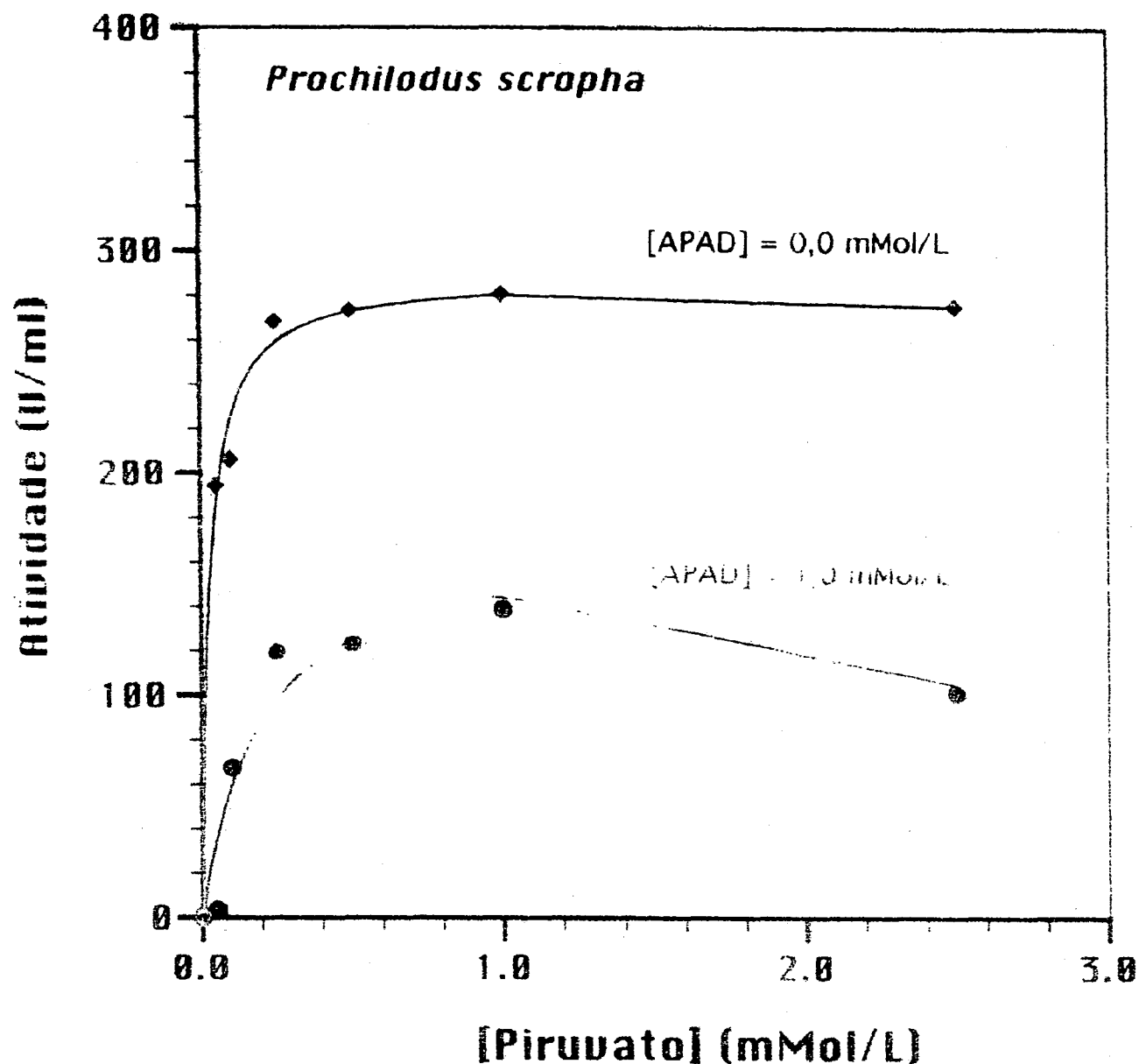


Fig. 19 - Efeito do piruvato e do APAD (3-acetilpiridina-adenina dinucleotídeo) sobre a atividade da LDH de músculo estriado de *Prochilodus scropha*. O precipitado 70% (P70%) obtido como descrito em Métodos foi dialisado contra tampão fosfato 10mM, pH 6,5 , contendo β ME 1mM e glicerol 10% por aproximadamente 15 horas em câmara fria. A preparação assim obtida foi centrifugada a 10.000 rpm durante 30 min, em centrífuga refrigerada K70D. O sobrenadante (D70%) contendo 15,40 mg/ml de proteína foi utilizado para o estudo do efeito de 1,0 mM de APAD em diferentes concentrações de piruvato, como descrito em Métodos.

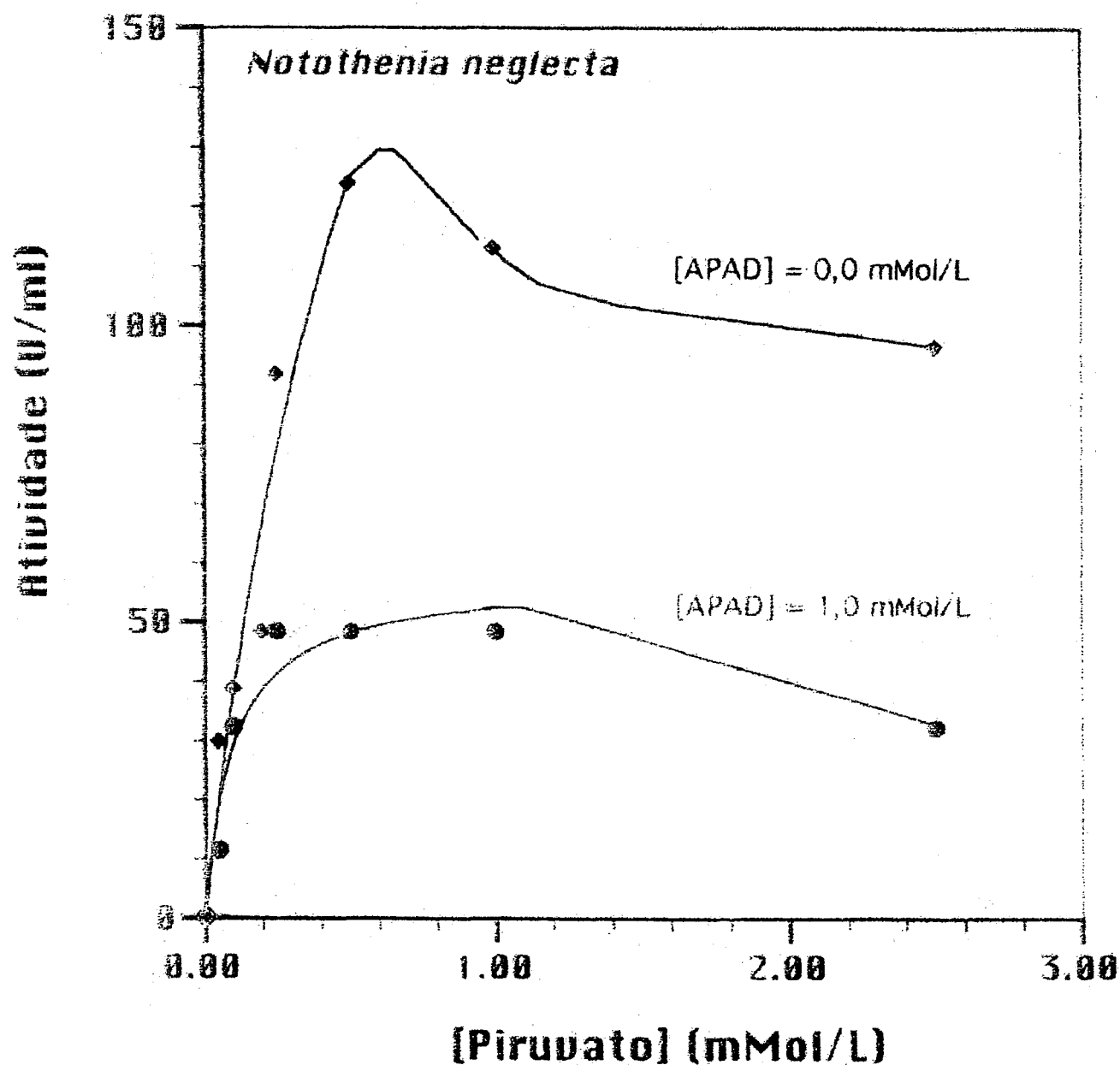


Fig. 20 - Efeito do APAD (3-acetil piridina-adenina dinucleotídeo) sobre a atividade da LDH de músculo estriado de *Notothenia neglecta*. O precipitado 70% (P70%) obtido como descrito em Métodos foi dialisado contra tampão fosfato 10mM, pH 6,5, contendo β ME 1mM e glicérol 10% por aproximadamente 15 horas em câmara fria. A preparação assim obtida foi centrifugada a 10.000 rpm durante 30 min, em centrífuga refrigerada K70D. O sobrenadante (D70%) contendo 10,67 mg/ml de proteína foi utilizado para o estudo do efeito de 1,0 mM de APAD em diferentes concentrações de piruvato, como descrito em Métodos.

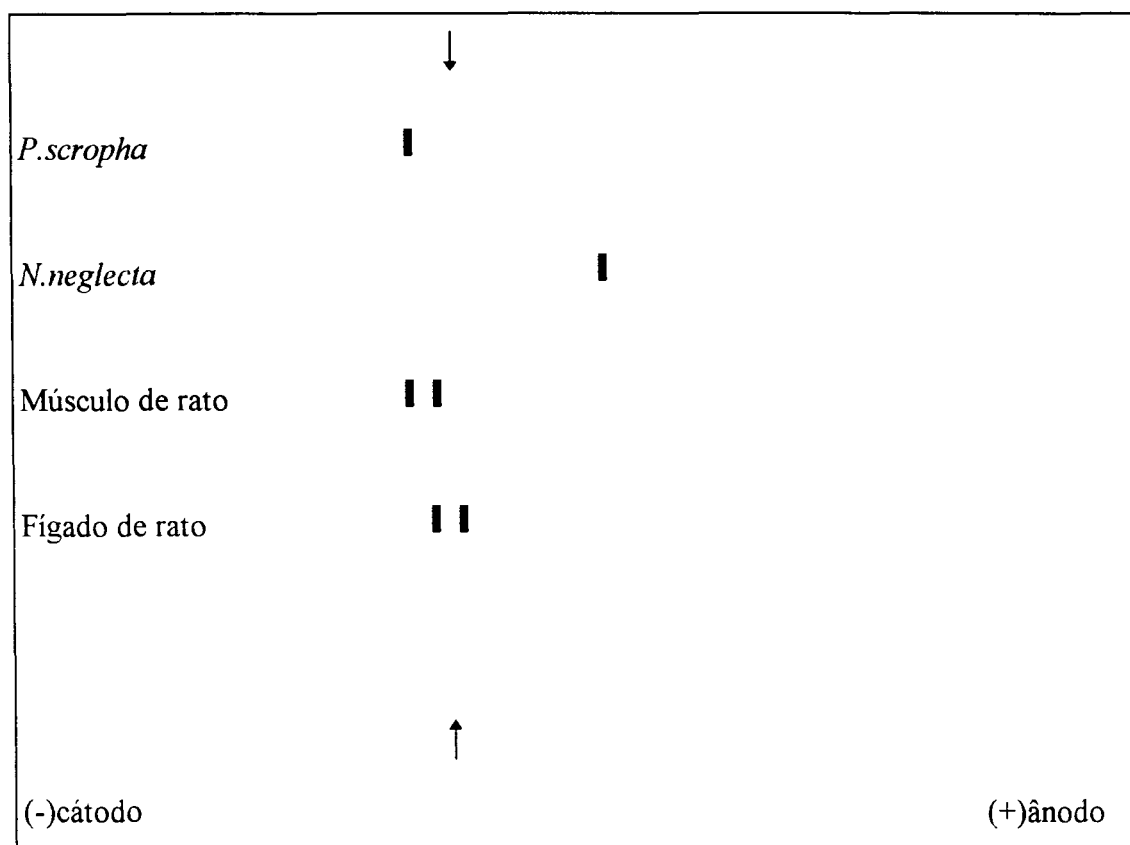


Fig. 21 - Perfil eletroforético de formas múltiplas da lactato desidrogenase de tecidos de rato comparadas com a lactato desidrogenase do músculo estriado de *Prochilodus scropha* e de *Notolthenia neglecta*. Aliquotas de 10 µl contendo 0,03-0,04 UI de enzimas por ml de *Prochilodus scropha* e *Notolthenia neglecta* foram aplicadas em fita de acetato de celulose e a eletroforese levada a efeito a 200 volts, durante 2 horas, em tampão barbital de sódio, 0,04 M, pH 8,6. As fitas foram reveladas sobre camada de ionagar 5mg/ml solidificada em placa de vidro, contendo lactato de lítio 0,1M, NAD⁺ 1,5mM, NBT 0,4mM, PMS 0,1mM, em estufa a 37°C, durante 40 minutos. Após a revelação, as fitas foram desidratadas em metanol puro e diafanizadas em solução contendo metanol 85%, ácido acético glacial 14% e glicerol 1%.

4. DISCUSSÃO

Vários trabalhos são relatados na literatura com enzimas da via glicolítica em peixes antárticos (SOMERO & HOCHACHKA, 1968; LOW & SOMERO, 1976; FITCH, 1988; BACILA *et al.*, 1989; FELLER *et al.*, 1991 e ZAMORA *et al.*, 1992). Entretanto, estudos bioquímicos em peixes antárticos, com relação a lactato desidrogenase, são limitados a poucos trabalhos (FITCH, 1988 ; BACILA *et al.*, 1989 e FELLER *et al.*, 1991).

BACILA *et al.* (1989), realizaram estudos sobre o metabolismo tecidual do “ice-fish” *Chaenocephalus aceratus*, estabelecendo os níveis das enzimas glicolíticas em músculo estriado, músculo cardíaco e encéfalo. Verificaram que o “ice-fish” possui níveis altos de PK, PFK, HK e em particular de LDH em todos os tecidos analisados. Estes mesmos autores verificaram que o “ice-fish” *Chaenocephalus aceratus* possui níveis enzimáticos, inclusive de LDH, superiores aos de outros peixes antárticos tais como *Notothenia rossii* e *Notothenia neglecta*.

Estes fatos mostram que um estudo mais aprofundado das enzimas do metabolismo glicídico é de fundamental importância para melhor se entender o comportamento bioquímico e fisiológico desses animais. Dentre essas enzimas a LDH foi utilizada, na presente pesquisa, a partir do músculo estriado de *Notothenia neglecta* e *Prochilodus scropha*.

A LDH tem sido purificada de várias fontes, tanto de animais como de vegetais, e muitos procedimentos para o isolamento da enzima foram utilizados. STRAUB (1940), purificou pela 1ª vez a LDH de coração de bovinos. A metodologia utilizada consistia em adsorção da enzima por fosfato de cálcio, eluições e várias etapas de precipitação com sulfato de amônio e acetona. O método amplamente utilizado na purificação da enzima durante os últimos 20 anos tem sido a cromatografia de troca iônica, com diethylamino ethyl cellulose (DEAE),

carboximetil-celulose (CMC) e fosfofocelulose (PC) (SCOPES, 1981).

Eluição por afinidade em cromatografia de troca iônica envolve a eluição de enzimas (ou outro ligante específico) por inclusão de um substrato ou ligante específico no tampão de eluição. Um ligante com carga liga-se à molécula de proteína reduzindo a carga total e então decrescendo a interação da proteína com o trocador iônico. Portanto, o ligante deve ter a mesma carga de trocador iônico, oposta à proteína a que vai ligar-se.

O presente experimento mostra eluição de LDH em cromatografia por afinidade em oxamato de agarose. Oxamato é um análogo estrutural do piruvato contendo um grupo amida que corresponde ao grupo metil do piruvato. É um inibidor da LDH estritamente competitivo com o piruvato. Os resultados apresentados nas tabelas I e II mostram que na passagem do extrato bruto (EB) pela coluna de oxamato de agarose ocorre uma purificação de 153,80 vezes para *Prochilodus scropha* e de 482,98 vezes para *Notothenia neglecta* com recuperação de 45,16 e 68,83 %, respectivamente. Sendo o $\text{NADH} + \text{H}^+$ adicionado a amostras de LDH e ao tampão de eluição, a LDH é retida na coluna e continua adsorvida enquanto $\text{NADH} + \text{H}^+$ é incluído no tampão de eluição, a LDH liga-se primeiro ao $\text{NADH} + \text{H}^+$, seguida do análogo ao piruvato. A LDH foi eluída tão logo o $\text{NADH} + \text{H}^+$ foi omitido do tampão de eluição (Figs. 1 e 2). Esses resultados são indicativos da possível formação de um sítio de ligação para o análogo do piruvato, que se forma na LDH quando ligada ao $\text{NADH} + \text{H}^+$, mas que está ausente na enzima livre (O'CARRA & BARRY, 1972). Esse comportamento da enzima torna o método duplamente específico, uma vez que a adsorção na oxamato-agarose seleciona a enzima em razão da especificidade ao oxamato e da especificidade ao $\text{NADH} + \text{H}^+$. Esses valores confirmam a especificidade desta resina à LDH, já descritos por O'CARRA & BARRY, 1972; O'CARRA & BARRY, 1974; FITCH, 1988; SASSAKI *et al.*, 1994.

GADE (1979), a partir do manto muscular de lula, *Loligo vulgaris*, ELLINGTON & LONG (1978), com músculo de craca gigante *Balanus nubilus* e THÉBAULT *et al.* (1981), com músculo caudal de camarão *Palaemon serratus* purificaram a LDH através de cromatografia de afinidade em Sephadex G-200. Nesse trabalho, GADE (1979), obteve um aumento de purificação e atividade específica de 378 vezes. Por sua vez, ELLINGTON & LONG (1978), determinaram que a purificação não resultou em aumento da atividade específica, mas removeu várias proteínas contaminantes e THÉBAULT *et al.* (1981), obtiveram um rendimento de 42% e purificação de 15 vezes.

Cromatografia de afinidade em Sepharose-5'AMP para a purificação da LDH foi executada por ELLINGTON & LONG (1978), que obtiveram purificação de 662 vezes e recuperação de 32% , a partir do músculo de craca gigante *Balanus nubilus*. THÉBAULT *et al.* (1981), utilizando a mesma resina de afinidade em purificação de LDH de músculo caudal de camarão *Palaemon serratus*, obtiveram aumento da atividade específica de cerca de 900 vezes e um rendimento de 13%. ZIETARA & SKORKOWSKI (1993), a partir de diferentes tecidos de bacalhau, *Gadus morhua*, utilizaram diferentes procedimentos para a purificação da LDH. Para LDH-A₄ e LDH-B₄ a purificação consistiu na obtenção do tecido, músculo cardíaco para LDH-B₄ e músculo esquelético branco para LDH-A₄ e aplicação na coluna de afinidade de oxamato-agarose. Para a obtenção da isoenzima LDH-B'₄ o tecido utilizado foi o estômago de bacalhau, em preparação que passou por várias resinas de purificação, cromatografia de troca iônica DEAE-celulose, blue-agarose e cromatografia de afinidade em Sepharose-5'AMP. Para LDH-C₄, o material de partida utilizado foi o fígado, cujo extrato bruto foi utilizado em cromatografia DEAE-celulose e cromatografia de afinidade oxamato-agarose. O rendimento e a purificação das isoenzimas da LDH das diversas fontes usadas, foi de 96% e 45 vezes para LDH-A₄, 21% e 35 vezes para LDH-B₄, 29% e 245 vezes para LDH- B'₄ e 59% e 62 vezes para LDH-C₄.

FITCH (1988), purificou a LDH a partir do músculo de *Notothenia neglecta* e de *Myoxocephalus scorpius*. Os tecidos foram aplicados em coluna de cromatografia de afinidade de oxamato-agarose, obtendo purificação de 6-13 vezes com rendimento de 90%. SASSAKI *et al.* (1994), purificaram a LDH de glândulas submandibulares de rato, *Rattus norvegicus albinus* em cromatografia de afinidade de oxamato-agarose e obtiveram recuperação de 65% e purificação de 540 vezes.

SASAKI *et al.* (1989) e SASSAKI *et al.* (1994), utilizaram para purificação de isoenzimas LDH-A₄ e LDH-B₄, cromatografia de afinidade em Blue-Sepharose 6B, a partir de músculo de *Oryzias latipes* e glândulas submandibulares de rato, *Rattus norvegicus albinus*, respectivamente. SASAKI *et al.* (1989), obtiveram purificação de 82 vezes para LDH-A₄ e 117 vezes para LDH-B₄ com recuperação de 3,36 e 13% para LDH-A₄ e LDH-B₄, respectivamente. SASSAKI *et al.* (1994), obtiveram purificação de 26,8 vezes e recuperação de 26%. Outro experimento descrito na literatura foi o de JAVED *et al.* (1995), utilizando cromatografia em colchicina-Sepharose e inativação pelo calor a 80°C durante 30 minutos. Assim, purificaram a LDH-I do fígado de *Uromastix hardwickii* obtendo recuperação de 17,38% e um fator de purificação de 17,23 vezes.

Nossos resultados de purificação e recuperação, partindo-se do extrato bruto de músculo esquelético branco de *Prochilodus scropha* e de *Notothenia neglecta*, podem ser considerados satisfatórios, o que vem a confirmar a especificidade da resina oxamato-agarose para a purificação da LDH, embora a fração purificada, para ambas as espécies, tenha se apresentado instável, perdendo cerca de 10-15% da atividade por dia, mantida a 4°C. A fração purificada da resina oxamato-agarose foi mantida em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, a 4°C, contendo glicerol 20%. Esta preparação manteve a atividade constante por aproximadamente 2 meses.

É interessante notar que nas preparações das figuras 1 e 2 ocorreu o aparecimento de duas faixas muito nítidas de atividade da LDH, uma delas consistindo de concentração menor ligada ao primeiro pico de proteína obtida no processo de eluição do material fixado na coluna. Deve-se considerar a possibilidade da existência, no material estudado, de duas formas de LDH distintas entre si ou por outro lado que a proteína eluída de início esteja contaminada de LDH.

As diferenças na inibição da LDH pelo seu substrato tem sido sugerida como base para se distinguir o desempenho fisiológico para isoenzimas da LDH da maioria dos vertebrados. A LDH tipo H tem atividade máxima em baixas concentrações de piruvato sendo fortemente inibida em altas concentrações. O tipo M mantém sua atividade em altas concentrações de piruvato. A inibição da LDH do coração pelo piruvato favorece sua oxidação bem como do lactato pela mitocôndria, enquanto a LDH do músculo esquelético permite o suprimento rápido de energia via glicólise, convertendo as grandes quantidades de piruvato que se formam em lactato e liberando-o para o sangue, devendo ser usado como fonte de energia pelo coração, principalmente durante exercícios vigorosos, em estado de hipóxia ou durante a sua recuperação (DAWSON *et al.*, 1964; MENDIOLA & DE COSTA, 1991). O mecanismo proposto para inibição da LDH pelo piruvato é a formação do complexo ternário abortivo, LDH-NAD⁺-piruvato, resultando na interação do NAD⁺ com o piruvato e a enzima. A oxidação do NADH+ H⁺ para NAD⁺ durante a redução catalisada pela LDH de piruvato para lactato resulta na formação do complexo ternário. Este complexo inibe competitivamente a redução de piruvato pelo NADH+ H⁺. A constante de dissociação para o complexo ternário da LDH do músculo cardíaco é menor do que para a LDH do músculo esquelético, com o resultado de que a LDH do coração é inibida em condições fisiológicas enquanto que a forma muscular esquelética tem significativa atividade.

As concentrações de substrato e de coenzima são fatores importantes no sistema da LDH. A LDH tem habilidade para formar

complexos inativos ternários entre a enzima, a coenzima e o substrato, e a inibição da LDH é um resultado deste complexo. Altas quantidades de $\text{NADH}+\text{H}^+$, induzem uma dissociação do complexo inativo causando reativação da enzima e oxidação do $\text{NADH}+\text{H}^+$, ocorrendo o efeito contrário se a concentração de $\text{NADH}+\text{H}^+$ diminuir, levando à formação do complexo inativo e portanto a um bloqueio da oxidação do $\text{NADH}+\text{H}^+$. O complexo ternário tem papel regulador no metabolismo do piruvato-lactato (FROMM, 1963; EVERSE *et al.*, 1971; NARITA & HORIUCHI, 1979; DE ARRIAGA *et al.*, 1982 e HAMM, 1990).

Os efeitos da temperatura sobre a estrutura das enzimas e a sua função sempre foram do interesse de pesquisadores da área biológica. Na determinação do efeito da temperatura sobre a atividade da LDH do músculo de *Prochilodus scropha* esta apresentou-se estável em 5°C aumentando a atividade após 20 minutos de incubação e decrescendo sua atividade em 50°C após 5 minutos. Em 30°C houve aumento de 50% na atividade da LDH. Lactato desidrogenase de *Notothenia neglecta* apresentou estabilidade em 5°C , decrescendo sua atividade com o aumento da temperatura. Na temperatura de 20°C a LDH apresentou o dobro da atividade em relação à atividade medida a 5°C (Figs. 7 e 8).

A atividade da LDH aumenta com a elevação da temperatura e da concentração de piruvato, atingindo atividade máxima em concentrações de piruvato de 0,50-0,75mM para *Prochilodus scropha*. Para *Notothenia neglecta* a atividade máxima foi em concentração de piruvato de 0,75mM. O K_M para piruvato se elevou com o aumento da temperatura para *Prochilodus scropha* e para *Notothenia neglecta* (Figs. 9 e 10) (Tabela IV). O K_M da LDH do músculo esquelético de *Notothenia neglecta* apresentou valores mais altos do que aqueles obtidos para *Prochilodus scropha*. Valores menores de K_M foram obtidos para *Prochilodus scropha* quando medida a atividade da LDH a 10°C (0,09 mM). Nessa mesma temperatura o K_M para a LDH de *Notothenia neglecta* foi de 0,24mM. Os valores de K_M mantiveram-se constantes para *Prochilodus scropha* em 20 e 30°C ,

(0,13mM), e para *Notothenia neglecta* a 20 e 30°C tendo sido de 0,31 e 0,33mM, respectivamente (Tabela IV). Esse fenômeno foi também encontrado por COWEY *et al.* (1969), LOPEZ LEMUS (1987) e NARITA & HORIUCHI (1979) tendo sido interpretado como uma adaptação que assegura as enzimas reter a capacidade de elevar a taxa catalítica quando a concentração de substrato se eleva durante a atividade metabólica, refletindo em fatores específicos de adaptações bioquímicas desses organismos.

EBY *et al.* (1973), compararam a atividade da LDH do músculo cardíaco e do músculo esquelético de rã *Rana pipiens* a diferentes temperaturas. Foi verificado, que no caso da LDH de músculo esquelético os valores de K_M se elevaram na medida em que a temperatura também se elevou. No caso de LDH de músculo cardíaco, o K_M para piruvato foi de 0,12 a 10°C, 0,15, a 25°C e de 0,13mM, a 40°C.

GEREZ DE BURGOS *et al.* (1973; 1974), com músculo esquelético e com músculo cardíaco de serpente *Bothrops neuwiedii*, verificaram que em diferentes concentrações de piruvato e em distintas temperaturas, a atividade da LDH aumenta e chega a atividade máxima em pequenas concentrações de piruvato (0,01-0,05 mM) a 10°C, o que não ocorre a 35°C. Para todas as amostras estudadas, tanto para as preparações de LDH de *Bothrops neuwiedii* como de preparações comerciais de LDH de músculo cardíaco e de esquelético de bovinos, os valores de K_M diminuíram com o decréscimo da temperatura, a redução tendo sido maior para a LDH de *Bothrops neuwiedii*. Não houve inibição da atividade da LDH-A₄ em altas concentrações de lactato (200mM). A atividade da LDH medida a 10°C com lactato 200mM foi de 60% para a isoenzima de LDH-B₄ de ambas as espécies e a 35°C foi de 77% para as isoenzimas de *Bothrops neuwiedii* e 80% para as de bovino. Os valores de K_M para lactato de isoenzimas B₄, para ambas as espécies, não foram afetados pela temperatura.

SHAKLEE *et al.* (1977), analisaram a atividade da LDH de diferentes tecidos de *Lepomis cyanellus* “green sunfish” aclimatados a 5 e 25°C. A atividade da LDH de músculo cardíaco, olho, cérebro e fígado permaneceu constante nas diferentes temperaturas. Entretanto, a atividade da LDH do músculo esquelético aumentou com o aumento da temperatura.

A energia de ativação para a LDH de *Prochilodus scropha* e de *Notothenia neglecta* foi medida entre 10 e 50°C e calculada de acordo com a equação de Arrhenius. De acordo com os dados da Fig. 11, a energia de ativação calculada foi como sendo da ordem de 7.591 e 6.567 cal/mol para *Prochilodus scropha* e *Notothenia neglecta*, respectivamente.

Outro fator a ser considerado é o efeito da concentração hidrogênionica das preparações de LDH de *Prochilodus scropha* e *Notothenia neglecta*. A atividade da LDH parcialmente purificada de *Prochilodus scropha* e de *Notothenia neglecta*, com relação a diferentes valores de pH, foi máxima em torno de 7,5 e 6,5 a 7,0, respectivamente (Figs. 3 e 4). Esses resultados estão de acordo com o observado por THÉBAULT (1984) ; SASAKI *et al.* (1989) ; ALMEIDA-VAL *et al.* (1991) e SASSAKI *et al.* (1994) em LDH obtida de diferentes tecidos e organismos. De modo similar, com relação a LDH estudada a partir de diferentes fontes, conforme experimentos observados por HOCHACHKA & LEWIS (1971) ; GEREZ DE BURGOS *et al.* (1973) ; WILSON (1977) ; DOUMEN *et al.* (1986) e MARTÍNEZ *et al.* (1994) os valores de K_M da LDH para piruvato de ambas as espécies aumentaram com a elevação do pH. O valor mínimo do K_M foi obtido em pH 7,0 para *Prochilodus scropha* com a atividade máxima obtida em concentrações de piruvato de 0,15-0,20 mM. Para *Notothenia neglecta*, o valor mínimo do K_M foi obtido em pH 6,0 e a atividade da LDH foi máxima com piruvato 0,75 mM em pH 6,0 e 7,0.

Lactato desidrogenase do músculo de *Notothenia neglecta* apresentou valores de K_M superiores aos de *Prochilodus scropha* e concentrações crescentes de piruvato “in vitro” não apresentaram efeito inibitório para *Notothenia neglecta*, em pH 8,0. Até que ponto as variações dos valores cinéticos apresentados são uma resultante dos mecanismos biológicos de adaptação desses peixes a ambientes distintos não se pode ainda chegar a uma conclusão clara. Este resultado para *Notothenia neglecta* concorda com o encontrado por FITCH (1988), que determinou a atividade máxima para o músculo esquelético de *Notothenia neglecta* em 2,5 mM de piruvato e SASAKI *et al.* (1989), com músculo esquelético branco de *Oryzias latipes*, determinaram o K_M para piruvato em 0,62 mM.

HOCHACHKA (1965), estudando a atividade da LDH de fígado de “goldfish” *Carassius carassius* mostra a ocorrência de cinética hiperbólica na relação entre velocidade e concentração de substrato quando medida a pH 8,0. Esse mesmo fato foi demonstrado por LDH de músculo esquelético em experimento conduzido a pH 7,15. Entretanto, em pH 9,05 e 10,15 a atividade de LDH de ambas as fontes mostram curva cinética caracteristicamente sigmoidal.

GEREZ DE BURGOS *et al.* (1973), compararam a LDH do músculo esquelético e de cardíaco da serpente *Bothrops neuwiedii* com o de preparações comerciais de LDH de músculo esquelético e de cardíaco de bovino, em diferentes pH. O K_M da LDH para o piruvato aumenta com o aumento do pH sendo que a LDH de *Bothrops neuwiedii* apresentou-se mais sensível; em temperatura constante, o K_M para a LDH de *Bothrops neuwiedii* foi maior entre 7.4 e 8.0 do que entre 6.0 e 7.4. MENDIOLA & DE COSTA (1991), verificaram o efeito do pH (7,0, 7,4 e 8,0) em função da temperatura (15, 20 e 30 °C) na LDH do músculo cardíaco de *Rana perezi* e *Bufo calamita* de diferentes comportamentos e habitat. Os valores de K_M para piruvato de ambas as espécies aumentaram com o pH e temperatura, sendo que a velocidade máxima variou somente com a temperatura. Com relação ao K_M para lactato este diferiu com a temperatura e variação do pH para ambas as

espécies. O K_M para lactato de *Rana perezi* aumentou com relação a temperatura mas decresceu com relação ao aumento do pH enquanto que *Bufo calamita* não variou. A velocidade máxima em *Rana perezi* aumentou com a temperatura e em *Bufo calamita* a velocidade máxima variou com a temperatura e pH.

COPPES *et al.* (1992), estudaram o efeito da temperatura e de pH sobre a LDH do músculo esquelético branco de três espécies de peixes da família Scianidae *Micropogonias furnieri*, *Cynoscion striatus* e *Roncador stearnsii*. O K_M para piruvato permaneceu constante em pH 6,3 a 7,2 nas temperaturas estudadas (20, 25 e 30 °C), entretanto, com o aumento do pH (7,6 e 8,3) os valores de K_M aumentaram cerca de oito vezes, nas diferentes temperaturas, para as espécies analisadas. MARTÍNEZ *et al.* (1994), estudaram a LDH do músculo branco de duas espécies de peixes euritérmicos *Cynoscion arenarius* e *Cynoscion nebulosus*. O valor de K_M para piruvato na LDH do músculo branco na espécie *Cynoscion nebulosus* aumentou com o aumento do pH e da temperatura, enquanto que para *Cynoscion arenarius* permaneceu constante em pH 6,3 e 6,8 nas diferentes temperaturas (15, 20, 25 e 30 °C), aumentando consideravelmente em pH 7,6, nas temperaturas acima de 15 °C.

O efeito de inibidores clássicos da LDH, oxamato, oxalato e APAD foi verificado no presente experimento. O ácido oxâmico, um composto que se assemelha estruturalmente ao piruvato, inibe a reação da LDH por competição com o substrato. A LDH do músculo esquelético de *Prochilodus scropha* mostrou-se mais sensível à ação inibitória do oxamato do que a da *Notothenia neglecta*. Em concentração de oxamato de 2,0mM a LDH de *Prochilodus scropha* foi inibida em 70% enquanto que a de *Notothenia neglecta* foi inibida em 42% (Fig. 12). Em concentrações crescentes de piruvato e concentração fixa de oxamato, o K_M aparente foi de 0,0378 mM para *Prochilodus scropha* e de 0,0412 mM para *Notothenia neglecta*. Na ausência do oxamato o K_M foi de 0,0887 e 0,0936 mM para *Prochilodus scropha* e *Notothenia neglecta* (Figs. 13 e 14). A presença do oxamato

na reação causou alteração no K_M , sendo que para ambas as espécies este diminuiu em presença do inibidor por aproximadamente 50%. O K_M da LDH para o piruvato com oxamato foi similar para ambas as espécies (Tabela V). Com relação ao oxalato, ambas as espécies mostraram sensibilidade semelhante, com inibição de aproximadamente 40%, na maior concentração estudada, 3,0 mM. Na concentração de 0,1 mM de oxalato ocorreu inibição de 24 e 7% para *Prochilodus scropha* e *Notothenia neglecta*, respectivamente (Fig. 15). Em concentrações crescentes de piruvato e concentração fixa de oxalato, o K_M foi de 0,045 mM para *Prochilodus scropha* e de 0,110 mM para *Notothenia neglecta*. Na ausência do oxalato, o K_M foi de 0,041 e 0,128 mM para *Prochilodus scropha* e *Notothenia neglecta*, respectivamente. Houve alteração no K_M para o piruvato na presença do inibidor para *Notothenia neglecta*, este decresceu na presença do oxalato, em *Prochilodus scropha* o K_M permaneceu constante (Figs. 16 e 17)(Tabela IV).

Pelos valores obtidos no presente estudo o oxalato atua como inibidor não competitivo tanto para a LDH de *Prochilodus scropha* como para a LDH de *Notothenia neglecta*. Por outro lado, o oxamato aparenta ser inibidor incompetitivo para ambas as preparações de LDH.

ELLINGTON & LONG (1978), estudaram a LDH de músculo de craca gigante *Balanus nubilus* com relação ao efeito inibitório do oxamato e oxalato, tendo verificado inibição do tipo competitiva para os dois inibidores. JAVED *et al.* (1995), com fígado de *Uromastix hardwickii*, utilizaram vários inibidores, entre eles o oxalato, estes autores verificaram inibição de 70% e o K_M em 0,44 mM. HOCHACHKA (1965), em músculo esquelético de “goldfish” *Carassius carassius*, utilizou várias concentrações de oxamato e concentrações de piruvato em pH 8,0 e 9,0. Em pH 9,0, na concentração de 1×10^{-3} e 3×10^{-4} M de piruvato e em baixas concentrações de oxamato (1^{-6} - 1^{-4} M) a atividade da LDH aumentou aproximadamente 120%, na concentração saturante de piruvato, 3×10^{-3} M, o oxamato não aumentou a atividade da LDH, uma vez que todos ou a maioria dos

sítios de ligação da enzima com o substrato estavam preenchidos pelo piruvato. No pH 8,0 não ocorreu ativação da LDH nas diferentes concentrações de piruvato e oxamato, houve perda de aproximadamente 45% da atividade da LDH na maior concentração de oxamato, $1,0 \times 10^{-4}$ M, nas diferentes concentrações de piruvato. GADE (1979), com manto muscular de lula *Loligo vulgaris*, e SASSAKI *et al.* (1994), a partir de glândulas submandibulares de rato *Rattus norvegicus albinus*, verificaram o efeito do oxamato e oxalato na atividade da lactato desidrogenase, o primeiro tendo verificado a inibição pelo oxamato e oxalato competitiva obtendo um K_M em torno de 0,30 mM e 0,35 mM, respectivamente e SASSAKI *et al.* (1994), verificou que a inibição pelo oxamato é do tipo competitiva com relação ao piruvato e a inibição pelo oxalato é do tipo incompetitiva com relação ao piruvato. De acordo com HECK (1969), existem diferenças nos sítios de ligação dos dois complexos enzima-coenzima; o complexo enzima-NADH liga-se ao oxamato ou piruvato, enquanto o complexo enzima-NAD⁺ acomoda preferencialmente lactato ou oxamato.

Em concentrações crescentes de APAD, um análogo do NAD⁺ o qual possui o radical acetil no lugar da amida, a lactato desidrogenase de *Notothenia neglecta* apresentou-se mais sensível na menor concentração utilizada, 0,05 mM, com 80% de inibição e *Prochilodus scropha*, 30% de inibição (Fig. 18). Valores de K_M aparente da LDH para o piruvato foram de 0,189 e 0,1166 mM para *Prochilodus scropha* e *Notothenia neglecta*, respectivamente. Na ausência de APAD o K_M foi de 0,0286 e 0,682 mM para *Prochilodus scropha* e *Notothenia neglecta*, respectivamente. O K_M para *Prochilodus scropha* aumentou na presença do inibidor apresentando efeito contrário para *Notothenia neglecta*, decrescendo consideravelmente o K_M na presença do APAD. Com relação as duas espécies o K_M para *Prochilodus scropha* foi maior (Figs. 19 e 20). Estudos realizados em glândulas submandibulares de rato *Rattus norvegicus albinus* por SASSAKI *et al.* (1994), submetidos a diferentes concentrações de APAD, verificaram um inibição de 90% em relação ao lactato; THÉBAULT *et al.* (1981), a partir de músculo caudal de camarão,

estabeleceram inibição do tipo competitiva com relação ao lactato e K_M de 0,20 mM.

Lactato desidrogenase é um tetrâmero de PM 140.000, sendo composta de 3 subunidades polipeptídicas distintas, LDH-A, LDH-B E LDH-C, os quais têm sido estabelecidas através de estudos genéticos, bioquímicos e imunológicos. Enquanto as subunidades A e B exibem uma ampla distribuição nos tecidos, a subunidade C contém isoenzimas que são restritas nos tecidos neurais, digestivos, predominantemente no fígado e no olho (REHSE & DAVIDSON, 1985; FRANKEL, 1987; FITCH, 1988, COPPES *et al.*, 1992).

As formas moleculares de LDH foram separadas primeiramente por eletroforese onde observam-se geralmente 5 bandas (ou formas) sendo 2 referentes a formas parentais e 3 formas híbridas, todas tetraméricas. As formas parentais foram denominadas de H e M de acordo com a predominância de cada uma no coração e no músculo, respectivamente. O tipo H é composto de 4 subunidades H (H_4) e o tipo M de quatro subunidades M (M_4), enquanto as 3 formas de LDH são híbridos moleculares consistindo de misturas das subunidades : M_3H , M_2H_2 e MH_3 . LDH do tipo H é abundante em tecidos com metabolismo predominantemente aeróbico, enquanto em tecidos anaeróbicos prevalece a enzima tipo M.

As isoenzimas da LDH podem ser visualizadas submetendo-se uma amostra à eletroforese, em pH 8,6. Neste pH, as isoenzimas possuem cargas diferentes e migram para cinco regiões distintas na eletroforese, estas são localizadas pela sua capacidade de catalisar a redução de um corante incolor à sua forma corada e insolúvel. A isoenzima H_4 é também chamada LDH1 e na eletroforese tem maior mobilidade em direção ao ânodo. A isoenzima M_4 é também chamada LDH5 e corresponde à banda mais próxima do cátodo. Os híbridos são denominados LDH2 (MH_3), LDH3 (M_2H_2) e LDH4 (M_3H). Os homogeneizados dos músculos esqueléticos de *Prochilodus scropha* e de *Notothenia neglecta*, quando aplicados em

fita de acetato de celulose apresentaram perfil eletroforético característico para estes tecidos, revelando a presença de uma única isoenzima correspondente ao tipo M₄ (A₄). A LDH-4 do músculo de *Notothenia neglecta* migra para o ânodo e a LDH-4 do músculo de *Prochilodus scropha* migra para o cátodo, em tampão barbital de sódico, pH 8,6 (Fig. 21). Este resultado confirma com o encontrado em *Prochilodus scropha* por FENERICH-VERANI *et al.* (1990). Estes autores analisaram tecidos de *Prochilodus scropha* em diferentes estágios de desenvolvimento embriológico, a LDH-B₄ esteve presente durante todo o estágio embriológico desta espécie e se expressou em todos os tecidos analisados, a LDH-A₄ expressou-se, predominantemente, no músculo esquelético branco e foi primeiramente detectada quando a larva mostrou sinais acentuados de natação, onde esta enzima tem um importante papel na produção de energia anaeróbica.

Segundo SIDELL & BELAND (1980) e TSUJI *et al.* (1994), a isoenzima LDH foi primeiramente identificada em um único locus como LDH tipo A e este locus, no processo da evolução, foi duplicado para formar os loci da LDH-A e LDH-B, sendo que o locus LDH-B foi duplicado para formar os loci da LDH-B e LDH-C, esta hipótese tem permanecido, uma vez que em Agnatha (lampréias) foi identificada uma única isoenzima LDH do tipo A₄.

A presença de isoenzimas com diferentes propriedades em diferentes temperaturas é um fato que ocorre durante a aclimação a temperaturas altas e baixas para a manutenção de características enzimáticas, como o Km. Enquanto caracteres morfológicos e ecológicos são similares entre *Notothenia neglecta* e *Prochilodus scropha*, dissimilaridades surgem em um nível bioquímico, possivelmente em resposta a diferentes temperaturas impostas para cada espécie.

A isoenzima LDH-M₄ ocorre em maior concentração no músculo esquelético branco. Este tecido geralmente é pobre no suprimento de sangue, apresenta capacidade reduzida para oxidar piruvato, onde uma grande fração de

energia para a contração é obtida da glicólise anaeróbica. Consequentemente a conversão do piruvato para lactato é de grande importância neste tecido do que na musculatura vermelha. Segundo BALDWIN (1975), o nível da atividade total de enzimas nos tecidos pode ser ajustado por mudanças na eficiência catalítica como também por alteração na quantidade da enzima, a qual deve ser sustentada como uma vantagem adaptativa para espécies que dependem de um grau maior da glicólise anaeróbica e que apresentam valores de ΔG^+ em LDH-M₄ mais baixo.

Espécies antárticas são especializadas a condições de frio. Mudanças sazonais na temperatura são menores do que 0,2°C, organismos adaptados a baixas temperaturas apresentam taxa metabólica de descanso alta. Parte do metabolismo de descanso elevado de espécies antárticas deve ser devido a manutenção de um sistema nervoso e sistema sensorial eficientes, a síntese de proteínas anticongelantes e a atividade fisiológica. Durante a evolução estes organismos tiveram que compensar a ausência de bexiga natatória incorporando lipídeos, reduzindo a densidade e envolvendo adaptações hidrodinâmicas para flutuações. Na ausência de mecanismos compensatórios, os processos fisiológicos devem proceder mais lentamente nestas espécies do que em espécies tropicais, por exemplo.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados no presente trabalho, podemos chegar às seguintes conclusões :

1. A desidrogenase do lactato de *Prochilodus scropha* e a de *Notothenia neglecta* preparadas em cromatografia de afinidade de oxamato-agarose foram purificadas 153,80 vezes para a de *Prochilodus scropha* e 482,98 vezes para a de *Notothenia neglecta* com recuperação de 45,16 e 68,83 %, respectivamente.
2. Lactato desidrogenase de *Prochilodus scropha* e de *Notothenia neglecta* apresentaram pH ótimo em torno de 6,5-7,5 e 6,6-7,0, respectivamente.
3. Os valores das constantes de Michaelis-Menten encontrados em função do pH foram para *Prochilodus scropha* em pH 6,0, 0,048 mM; em pH 7,0, 0,046 e em pH 8,0, 0,144 mM. Os valores encontrados para *Notothenia neglecta* foram em pH 6,0, 0,044 mM; em pH 7,0, 0,1526 mM e em pH 8,0, 0,277 mM.
5. Os valores das constantes de Michaelis-Menten encontrados em função da temperatura foram para *Prochilodus scropha* a 10°C, 0,091mM; a 20°C, 0,13 e a 30°C, 0,13 mM. Os valores encontrados para *Notothenia neglecta* foram a 10°C, 0,24mM; a 20°C, 0,31mM e a 30°C, 0,33mM.
6. A energia de ativação da LDH do músculo esquelético branco de *Prochilodus scropha* foi de 7.591 cal/mol e da *Notothenia neglecta*, 6.567 cal/mol.
7. Lactato desidrogenase do músculo de *Prochilodus scropha* foi inibida em 21% de sua atividade com oxamato 0,1mM e a de *Notothenia neglecta* em 2,34%. O K_M para piruvato na presença de oxamato 0,5mM foi de 0,0378mM e 0,0412 mM para LDH de *Prochilodus scropha* e de *Notothenia neglecta*, respectivamente.

8. Lactato desidrogenase do músculo de *Prochilodus scropha* foi inibida em 24% de sua atividade com oxalato 0,1mM e a de *Notothenia neglecta* 7,0%. O K_M para piruvato na presença de oxalato 0,5mM foi de 0,045mM e 0,11mM para LDH de *Prochilodus scropha* e a de *Notothenia neglecta*, respectivamente.
9. O oxalato atua como inibidor não competitivo tanto para LDH de *Prochilodus scropha* como para a LDH de *Notothenia neglecta*. Por outro lado, oxamato aparenta ser inibidor incompetitivo para ambas as preparações de LDH.
10. Lactato desidrogenase do músculo de *Prochilodus scropha* foi inibida em 32% de sua atividade com APAD 0,05mM e a de *Notothenia neglecta* 80,0%. O K_M para piruvato na presença de APAD 1,0mM foi de 0,19mM e 0,12mM para LDH de *Prochilodus scropha* e a de *Notothenia neglecta*, respectivamente.
11. No músculo esquelético branco de *Prochilodus scropha* está presente a isoenzima LDH-M4 cuja característica eletroforética é a da sua migração para o cátodo, em tampão barbital sódico, pH 8,6. Com relação à LDH do músculo de *Notothenia neglecta* a isoenzima LDH-M4 apresenta característica eletroforética de migração para o ânodo, em tampão barbital sódico, pH 8,6.

6. SUMÁRIO

Foi realizado estudo comparativo de purificação, propriedades cinéticas e distribuição tecidual de lactato desidrogenase (L-Lactato : NAD⁺ oxidorreductase, E.C.1.1.1.27) de músculo epaxial de peixes, *Prochilodus scropha*, uma espécie tropical e *Notothenia neglecta*, uma espécie antártica. A purificação da LDH foi levada a efeito em cromatografia por afinidade de oxamato-agarose, tendo sido possível obter valores satisfatórios de purificação. Para o estudo cinético a LDH foi purificada por precipitação com sulfato de amônio a 70%, centrifugada e dialisada. Em LDH de ambas as espécies estudou-se o efeito da concentração hidrogeniônica, a LDH apresenta pH ótimo em torno de 6,5 a 7,5 e 6,6 a 7,0, para *P. scropha* e *N. neglecta*, respectivamente. A energia de ativação foi de 7.591 e 6.567 cal/mol para *P. scropha* e *N. neglecta*, respectivamente. O estudo do efeito da temperatura sobre o K_M da LDH para o piruvato foram os seguintes: para LDH de *P. scropha* : 0,09mM, 0,13mM e 0,13mM de piruvato a 10⁰C, 20⁰C e 30⁰C, respectivamente; para LDH de *N. neglecta*: os valores de K_M em diferentes temperaturas foram :0,24mM, 0,31mM e 0,33mM de piruvato a 10⁰C, 20⁰C e 30⁰C, respectivamente. O efeito do pH nos valores de K_M de ambas as preparações de LDH foram as seguintes: para LDH de *P. scropha*: 0,048mM, 0,046mM e 0,144mM de piruvato em pH 6,0, 7,0 e 8,0, respectivamente; para LDH de *N. neglecta*: os valores de K_M nos diferentes pH foram os seguintes: 0,044mM, 0,153mM e 0,277mM de piruvato em pH 6,0, 7,0 e 8,0, respectivamente; Ambas as preparações de LDH foram sensíveis quando incubadas a altas temperaturas, incubação por 30 minutos a 50⁰C causou acentuada inativação da LDH de ambas as fontes. Com relação aos inibidores, o oxalato atua como inibidor não competitivo tanto para LDH de *P. scropha* como para LDH de *N. neglecta*. Por outro lado, oxamato aparenta ser inibidor incompetitivo para ambas as preparações de LDH. O APAD - 3-acetilpiridina adenina dinucleotídeo, é um potente inibidor das preparações de LDH, sendo a LDH de *N. neglecta* mais sensível do que a LDH de *P. scropha*. O perfil eletroforético de ambas

as preparações mostraram, em acetato celulose, uma única faixa de proteína. Entretanto, em tampão barbital, pH 8,6, a LDH de *P. scropha* migra para o cátodo enquanto que a LDH de *N. neglecta* migra para o ânodo.

SUMMARY

It has been carried out a comparative study on the purification, tissue distribution and kinetic properties of the lactate dehydrogenase (L-lactate:NAD⁺ oxidoreductase, E.C.1.1.1.27) from the epaxial muscle of the tropical fish *Prochilodus scropha* and the Antarctic fish *Notothenia neglecta*. Purification of LDH from both sources was carried out either by salting out with 70% sat. ammonium sulfate or by oxamate-agarose affinity chromatography. The following kinetic properties were experimentally established for the LDH preparations from both biological sources: optimum pH, 6.5 - 7.5 (*P. scropha*) and 6.6 - 7.0 (*N. neglecta*); energy of activation according to Arrhenius: 7.591 Kcal/mol for LDH from *P. scropha* and 6.567 Kcal/mol, for LDH from *N. neglecta*; values for K_M at different temperatures were as follows: for LDH from *P. scropha*: 0.09mM, 0.13mM and 0.13mM pyruvate at 10°C, 20°C and 30°C, respectively; for LDH from *N. neglecta*, values for K_M at different temperatures were as follows: 0.24mM, 0.31mM and 0.33mM pyruvate at 10°C, 20°C and 30°C, respectively. The effect of pH on the K_M values of both preparations of LDH was also assayed giving the following results: for LDH from *P. scropha*: 0.048mM, 0.046mM and 0.144mM pyruvate at pH 6.0, 7.0 and 8.0 respectively; for LDH from *N. neglecta*, 0.044mM, 0.153mM and 0.277mM pyruvate at pH 6.0, 7.0 and 8.0 respectively. Both preparations of LDH were very sensitive to incubation at high temperatures. Incubation for 30 minutes at 50°C causes appreciable heat inactivation of both preparations. According to the experiments carried out, oxalate acts as a non-competitive inhibitor for both preparations of LDH from *P. scropha* and from *N. neglecta*. On the other hand, oxamate seems to inhibit both preparations of LDH as an incompetitive inhibitor. APAD = 3, acetyl pyridineadenine dinucleotide, on its turn, is a powerful inhibitor of these LDH preparations, the LDH from *N. neglecta* being much more sensitive to it than de LDH preparation from *P. scropha*. The eletrophoretic profile of these LDH preparation showed in cellulose acetate showed a single band of protein for either

preparation. However, it has been found that in barbital buffer, pH 8.6, the LDH from *P. scropha* migrates towards the cathode while the LDH from *N. neglecta* migrates towards the anode.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA-VAL, V.M.F.; SCHWANTES, M.L.B. & VAL, A.L.; LDH Isozymes in Amazon fish. I. Electrophoretic studies on two species from Serrasalmidae Family : *Mylossoma duriventris* and *Colossoma macropomum*. **Comp. Biochem. Physiol.** **95 B (1)** : 77-84, 1990.
2. ALMEIDA-VAL, V.M.F.; SCHWANTES, M.L.B. & VAL, A.L.; LDH Isozymes in Amazon fish. II. Temperature and pH effects on LDH kinetic properties from *Mylossoma duriventris* and *Colossoma macropomum* (SERRASALMIDAE); **Comp. Biochem. Physiol.** **98 B (1)** : 79-86, 1991.
3. ALMEIDA-VAL, V.M.F.; SILVA, M.N.P.; CARACIOLO, M.C.M.; MESQUITA, L.S.B.; FARIAS, I.P. & VAL, A.L. ; LDH Isoenzymes in Amazon fish - III. Distribution patterns and functional properties in Serrasalmidae (Teleostei: Ostariophysi). **Comp. Biochem. Physiol.** **103 B (1)**: 119-125, 1992.
4. BACILA, M.; ROSA, R.; RODRIGUES, E.; LUCHIARI, P.H. & ROSA, C.D. ; Tissue metabolism of the ice-fish *Chaenocephalus aceratus* LOENBERG. **Comp. Biochem. Physiol.**, **92 B (2)** : 313-318, 1989.
5. BAILEY, G.S. & WILSON, A.C.; Homologies between isoenzymes of fishes and those of higher vertebrates. **J. Biol. Chem.** , **243 (22)** : 5843-5853, 1968.
6. BALDWIN, J. ; Selection for catalytic efficiency of lactate dehydrogenase M4 : correlation with body temperature and levels of anaerobic glycolysis. **Comp. Biochem. Physiol.**, **52 B** :33-37, 1975.

7. BALDWIN, J. STOREY, K.B. & HOCHACHKA, P.W.; Lactate dehydrogenase M4 of an abyssal fish : strategies for function at low temperature and high pressure. **Comp. Biochem. Physiol.**, **52 B** : 19-23, 1975.
8. BARNETT, H. ; Electrophoretic separation of lactate dehydrogenase isoenzymes on cellulose acetate. **Biochem. J.** , **84** : 83, 1962.
9. BERGMAYER, H.V. & BERN, T.E. ; Lactato desidrogenase U.V. assay with pyruvate kinase and LDH. In "Bergmeyer H.V. , Ed. Methods of enzymatic analysis. 2nd ed. New York, Verlag-Chemie, 1974.
10. CARVALHO, C.S.; SASSAKI, K.T.; BACILA, M. & ROSA, R.; Purification and kinetic properties of lactate dehydrogenase from the striated epaxial muscle of *Prochilodus scropha* (Pisces, Teleostei). XXIV^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, 1995a.
11. CARVALHO, C.S.; SALVO, L.M.; BACILA, M. & ROSA, R.; Níveis da lactato desidrogenase (LDH) no soro de peixes das famílias Cyprinidae, Cichlidae e Loricariidae. II Simpósio sobre Ciências Médicas e Biológicas, 1995b.
12. CARVALHO, C.S.; ROSA, R.; SASSAKI, K.T. & BACILA, M.; Estudos cinéticos de lactato desidrogenase de peixes antárticos e de peixes tropicais. I. Purificação de LDH de músculo epaxial de *Notothenia neglecta* e de *Prochilodus scropha* (Pisces, Teleostei). I Simpósio Brasileiro sobre Biologia Antártica, 1996a.
13. CARVALHO, C.S.; SASSAKI, K.T.; BACILA, M. & ROSA, R.; The effect of temperature on the lactate dehydrogenase from the striated epaxial muscle of *Prochilodus scropha*. Steindachner, 1881(Pisces, Teleostei). XI^a Reunião

Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 1996b.

14. COPPES, Z.L.; SCHWANTES, M.L.B. & SCHWANTES, A.R.; Adaptative features of enzymes from family Scianidae - III. Studies on lactate dehydrogenase (LDH) of fishes from the south coast of Uruguay. **Comp. Biochem. Physiol.** **88 B (3)** : 1005-1012, 1987.

15. COPPES, Z. ; Lactate dehydrogenase in teleosts. The role of LDH-C4 isozyme. **Comp. Biochem. Physiol.**, **102 B (4)** : 673-677, 1992.

16. COPPES, Z. ; MARTÍNEZ, G. & HIRSCHHORN, M. ; pH and Temperature effects on the K_M values of muscle Lactate Dehydrogenase isozyme LDH-A₄ from fishes of the family Scianidae (Perciformes); **Comp. Biochem. Physiol.** **103 B (4)** : 869-874, 1992.

17. COWEY, C.B.; LUSH, I.E. & KNOX, D.; Studies on crystalline Lactate Dehydrogenase from cardiac an skeletal muscle of plaice (*Pleuronectes platessa*) with particular reference to temperature. **Biochim. Biophys. Acta**, **191**: 205-213, 1969.

18. DAVIE, P.S.; WELLW, R.M.G. & TETENS, V.; Effects of sustained swimming on rainbow trout muscle structure, blood oxygen transport, and lactate dehydrogenase isozymes : Evidence for increased aerobic capacity of white muscle. **J. Exp. Zoo.**, **237**: 159-171, 1986.

19. DAWSON, D.M.; GOODFRIEND, T.L. & KAPLAN, N.O.; Lactic dehydrogenases : functions of the two types. Rates of synthesis of the two major forms can be correlated with metabolic differentiation. **Science**, **207**: 769-770, 1964.

20. DE ARRIAGA, D.; SOLER, J. & CADENAS, E.; Influence of pH on the allosteric properties of lactate dehydrogenase activity of *Pleycomyces blakesleeanus*. **Biochem. J.**, 203: 393-400, 1982.
21. DE WITT, H.H.; Coastal and deep-water benthic fishes of the Antarctic. **Am. Geogr. Soc. Antarct. Map Folio Ser. 15** : 1-10, 1971.
22. DIETZ, A.A. & LUBRANO, T.; Separation and quantitation of lactic dehydrogenase isoenzymes by disc electrophoresis. **Anal. Biochem.** , 20: 246-257, 1967.
23. DOUMEN, C.; D'SUZE, G.; VERHEYEN, E. & BLUST, R. ; Temperature and ph effects on the total white muscle LDH of *Oreochromis niloticus* (Pisces; Cichlidae) ; **Comp. Biochem. Physiol.** 83 B (2) : 441-444, 1986.
24. EBY, D.; SALTHER, S. & LUKTON, A.; Frog lactate dehydrogenase: kinetics at physiological enzyme levels; **Biochem. Biophys Acta**, 327: 227-232, 1973.
25. ELLINGTON, W.R. & LONG, G.L.; Purification and characterization of a highly unusual tetrameric D-lactate dehydrogenase from the muscle of the giant barnacle, *Balanus nubilus* Darwin; **Arch. Biochem. Biophys.** 186 (2) : 265-274, 1978.
26. EVERSE, J.; BARNETT, R.E.; THORNE, C.J.R. & KAPLAN, N.O.; The formation of ternary complexes by diphosphopyridine nucleotide-dependent dehydrogenases. **Arch. Biochem. Biophys.** , 143 : 444-460, 1971.
27. FELLER, G.; PAULY, J.P.; O'CARRA, P. & GERDAY, C. ; The lactate dehydrogenase of the icefish heart : biochemical adaptations to hypoxia

- tolerance. **Biochim. Biophys. Acta**, **1079** (3) : 343-347, 1991.
28. FENERICH-VERANI, N.; SCHWANTES, M.L.B. & SCHWANTES, A.R.;
Patterns of gene expression during *Prochilodus scrofa* (CHARACIFORMES :
PROCHILONTIDAE) embryogenesis - I. Lactate dehydrogenase. **Comp.
Biochem. Physiol.**, **97 B** (2): 235-246, 1990.
29. FITCH, N.A.; Lactate dehydrogenases in Antarctic and temperate fish species.
Comp. Biochem. Physiol. **91 B** (4) : 671-676, 1988.
30. FRANKEL, J.S.; Lactate dehydrogenase isozymes of the island barb, *Barbus
oligolepis* (CYPRINIFORMES, TELEOSTEI) : their characterization and
ontogeny. **Comp. Biochem. Physiol.**, **87 B** (3): 581-585, 1987.
31. FRITZ, P.J.; MORRISON, W.J.; WHITE, E.L. & VESELL, E.S.; Comparative
study of methods for quantitation of lactate dehydrogenase isozymes. **Anal.
Biochem.** , **36**: 443-453, 1970.
32. FROMM, H.J. ; Determination of dissociation constants of coenzymes and
abortive ternary complexes with rabbit muscle lactate dehydrogenase from
fluorescence measurements. **J. Biol. Chem.** , **238** (9) : 2938-2944, 1963.
33. GADE, G. ; Lactate specific, dimeric lactate dehydrogenase from the mantle
muscle of the squid, *Loligo vulgaris* : purification and catalytic properties.
Comp. Biochem. Physiol., **63 B**: 387-393, 1979.
34. GEREZ DE BURGOS, N.M.; BURGOS, C.; GUTIERREZ, M. & BLANCO, A.;
Effect of temperature upon catalytic properties of lactate dehydrogenase

- isoenzymes from a poikilotherm. **Biochim. Biophys. Acta**, **315**: 250-258, 1973.
35. GEREZ DE BURGOS, N.M.; BURGOS, C. & BLANCO, A. ; Effect of temperature upon inhibition by substrate of lactate dehydrogenase isoenzymes from a poikilotherm. **Biochim. Biophys. Acta**, **341** : 505-510, 1974.
36. HAMM, R. ; Lactatdehydrogenase und ihre bedeutung in der fleischforschung. **Fleischwirtschaft**, **70** (11) : 1336-1339, 1990.
37. HECK, H. d'A.; Porcine heart lactate dehydrogenase optical rotatory dispersion, thermodynamics, and kinetics of binding reactions. **J. Biol. Chem.** **244** : 4375-4381, 1969.
38. HENRY, T. & FERGUSON, A. ; Kinectic studies on the lactate dehydrogenase (LDH-5) isozymes of the brown trout, *Salmo trutta* L. **Comp. Biochem. Physiol.**, **82 B** (1) : 95-98, 1985.
39. HOCHACHKA, P.W.; Isozymes in metabolic adaptation of a poikilotherm: subunit relationships in lactic dehydrogenases of goldfish; **Arch. Biochem. Biophys.** **111**: 96-103, 1965.
40. HOCHACHKA, P.W. & SOMERO, G.N. The adaptation of enzymes to temperature. **Comp. Biochem. Physiol.**, **27** : 659-668, 1968.
41. HOCHACHKA, P.W. & LEWIS, J.K.; Interacting effects of ph and temperature on the Km values for fish tissue lactate dehydrogenases. **Comp. Biochem. Physiol.**, **39 B**, 925-933, 1971.

42. YANCEY, P.H. & SOMERO, G.N. Temperature dependence of intracellular pH: Its role in the conservation of pyruvate apparent K_M values of vertebrate lactate dehydrogenases. **J. Comp. Physiol.**, **125** : 129-134, 1978.
43. JAVED, M.H.; YOUSUF, F.A.; HUSSAIN, A.N.; ISHAQ, M. & WAQAR, M.A.; Purification and properties of lactate dehydrogenase from liver of *Uromastix hardwickii*. **Comp. Biochem. Physiol.**, **111 B** (1): 27-34, 1995.
44. KALOUSTIAN, H.D. ; STOLZENBACH, F.E.; EVERSE, J. & KAPLAN, N.O.; Lactate dehydrogenase of lobster (*Homarus americanus*) tail muscle. **J. Biol. Chem.** , **244** (11) : 2891-2901, 1969.
45. KLYACHKO, O.S. & OZERNYUK, N.D.; The effect of temperature on the kinetic properties of lactate dehydrogenase from embryos of various fish species. **Comp. Biochem. Physiol.** , **107 B** (4) : 593-595, 1994.
46. LÓPEZ LEMUS, L.G.; Temperature-adaptative differences in the kinetic properties of muscle-type lactate dehydrogenases of congeneric rocky-shore fishes from the Sea of Cortez. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** , **111** : 255-265, 1987.
47. LOW, P. & SOMERO, G.; Adaptation of muscle pyruvate kinase to environmental temperatures and pressures. **J. Exp. Zool.** , **198** : 1-11, 1976.
48. LOWRY, D.R.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J.; Protein measurement with the folin phenol reagent . **J. Biol. Chem.** , **193** : 265-275, 1951.
49. MARTINEZ, G.; BEHRENS, P. & COPPES, Z. ; pH and temperature influences on the K_m values of LDH-A4 from white muscles of two eurythermal

Scianidae fishes. **Comp. Biochem. Physiol.** **107 B (4)** : 645-648, 1994.

50. MENDIOLA, P. & DE COSTA, J. ; The effects of temperature and pH on the kinetic properties of heart muscle lactate dehydrogenase from anuran amphibians. **Comp. Biochem. Physiol.** **98 B (4)** : 529-534, 1991.
51. NARITA, J.I. & HORIUCHI, S. ; Effect of environmental temperature upon muscle lactate dehydrogenase in the crayfish, *Procambarus clarki* GIRARD. **Comp. Biochem. Physiol.** , **64 B**, 249-253, 1979.
52. O'CARRA, P. & BARRY, S. ; Affinity cromatography of lactate dehydrogenase. **FEBS Lett.**, **21** : 281-285, 1972.
53. O'CARRA, P. & BARRY, S. ; Lactate dehydrogenase specific ligand approach. **Methods Enzymol.**, **34** : 598-605, 1974.
54. OZERNYUK, N.D.; KLYACHKO, O.S. & POLOSUKHINA, E.S.; Aclimation temperature affects the functional and structural properties of lactate dehydrogenase from fish (*Misgurnus fossilis*) skeletal muscles. **Comp. Biochem. Physiol.** , **107 B (1)** : 141-145, 1994.
55. REHSE, P.H. & DAVIDSON, W.S.; Purification and properties of a C-type isozyme of lactate dehydrogenase from the liver of the atlantic cod (*Gadus morhua*). **Comp. Biochem. Physiol.**, **84 B**, 145-150, 1985.
56. SALVO, L.M.; CARVALHO, C.S. & BACILA, M.; The effect of pH on the activity of lactate dehydrogenase purified from the epaxial muscle of *Chaenocephalus aceratus* and *Hypostomus plecostomus* (Pisces, Teleostei). I Simpósio Brasileiro sobre Biologia Antártica, 1996.

57. SASAKI, T.; HYODO-TAGUCHI, Y.; IUCHI, I. & YAMAGAMI, K.;
Purification and partial characterization of the muscle LDH-A4 and -B4
isozymes and the respective subunits of the fish, *Oryzias latipes*. **Comp.
Biochem. Physiol.**, **93 B** (1) : 11-20, 1989.

58. SASSAKI, K.T.; ROSA, C.D.; CERQUEIRA CÉSAR, M. & ROSA, R.; Kinectic
aspects of rat (*Rattus norvegicus albinus*) submandibular glands lactic
dehydrogenase. **Arq. Biol. Tecnol.** **37** (2) : 333-343, 1994.

59. SCOPES, R.K.; Quantitative studies of ion-exchange and affinity elution
chromatography of enzymes. **Anal. Biochem.**, **114**: 8-18, 1981.

60. SHAKLEE, J.B.; CHRISTIANSEN, J.A.; SIDELL, B.D.; PROSSER, C.L. &
WHITT, G.S.; Molecular aspects of temperature acclimation in fish:
contributions of changes in enzyme activities and isozyme patterns to
metabolic reorganization in the green sunfish. **J. Exp. Zool.**, **201**: 1-20, 1977.

61. SIDELL, B.D. & BELAND, K.F.; Lactate dehydrogenase of atlantic hagfish:
Physiological and evolutionary implications of a primitive heart
isozyme. **Science**, **207**: 769-770, 1980.

62. SOLER, J.; DE ARRIAGA, D. BUSTO, F. & CADENAS, E. Lactate
dehydrogenase in *Phycomyces blakesleeanus*. **Biochem. J.**, **203** :83-391,
1981.

63. SOMERO, G. N.; pH-temperature interactions on proteins : principles of optimal
pH and buffer system design. **Mar. Biol. Letters.**, **2** : 163-178, 1981.

64. SOMERO, G. N. & HOCHACHKA, P.W.; The effect of temperature on catalytic and regulatory functions of pyruvate kinase of the rainbow trout and the Antarctic fish *Trematomus bernachii*. **Biochem. J.**, **110** : 395-400, 1968.
65. SPIELMAN, H. ; ERICKSON, R.P. & EPSTEIN, C.J.; The separation of lactate dehydrogenase x from other lactate dehydrogenase isozymes of mouse testes by affinity chromatography. **FEBS. Lett.**, **35** (1) : 19-23, 1973.
66. STRAUB, F.B.; Crystalline lactic dehydrogenase from heart muscle. **Biochem. J.**, **34**: 483-486, 1940.
67. TAKIGUCHI, H. ; MATSUKAWA, R.; TSUSHIMA, M.; ICHIHASHI, T. ; OSEKI, M. MATSUDA, T. & ABIKO, Y.; Isoenzyme pattern of lactate dehydrogenase in rat submandibular gland cells. **NIHON Univ. J. Oral SCI**, **18** : 287-292, 1992.
68. THÉBAULT, M.T.; BERNICARD, A. & LENNON, J.F.; Lactate dehydrogenase from the caudal muscle of the shrimp *Palaemon serratus*: Purification and characterization. **Comp. Biochem. Physiol.** **68 B**, 65-70, 1981.
69. THÉBAULT, M.T.; Lactate content and lactate dehydrogenase activity in *Palaemon serratus* abdominal muscle during temperature changes. **J. Comp. Physiol. B**, **154**: 85-89, 1984.
70. TSUJI, S.; QURESHI, M.A.; HOU, E.W.; FITCH, W.M. & LI, S.S.L.; Evolutionary relationships of lactate dehydrogenases (LDHs) from mammals, birds, an amphibian, fish, barley, and bacteria : LDH cDNA sequences from *Xenopus*, pig, and rat. **Proc. Natl. Acad. SCI**. **91** : 9392-9396, 1994.

71. TSUKUDA, H. ; Temperature dependency of the relative activities of liver lactate dehydrogenase isozymes in goldfish acclimated to different temperatures. **Comp. Biochem. Physiol.** , **52 B**, 343-345, 1975.
72. VESELL, E.S.; pH Dependence of lactate dehydrogenase isozyme inhibition by substrate. **Nature**, **5034** (23) : 421-422, 1966.
73. VESELL, E.S. & YIELDING, L. ; Effects of pH, ionic strength, and metabolic intermediates on the rates of heat inactivation of lactate dehydrogenase isozymes. **Proc. N.A.S.** , **56** : 1317-1324, 1966.
74. WILSON, T.L.; Interrelations between pH and temperature for the catalytic rate of the M₄ isozyme of lactate dehydrogenase (E.C. 1.1.1.27) from goldfish (*Carassius auratus* L.). **Arch. Biochim. Biophys.**, **179** : 378-390, 1977.
75. ZAMORA, J.M.; ROSA, R.; ROSA, C.D.; BIANCONCINI, M.S.C. & BACILA, M.; Purification and properties of pyruvate kinase from the striated muscle of the ice-fish *Chaenocephalus aceratus* Loenberg.; **Int. J. Biochem.**, **24** (11): 1833-1840, 1992.
76. ZIETARA, M.S. & SKORKOWSKI, E.F. ; Purification and properties of the heart type lactate dehydrogenase of the cod (*Gadus morhua*) from the baltic sea : comparison with LDH-A4 e LDH-C4. **Comp. Biochem. Physiol.**, **105 B**: 349-356, 1993.